



**ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE MATERIALES METÁLICOS DE  
BASE MAGNESIO MICROESTRUCTURADOS REABSORBIBLES  
Y MULTIFUNCIONALES PARA LA OSTEOSÍNTESIS DE  
FRACTURAS**

TESIS DOCTORAL

Carmen María Iglesias Urraca

2015





## **FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Cirugía

**Estudio *in vitro* e *in vivo* de materiales metálicos de base magnesio  
microestructurados reabsorbibles y multifuncionales para la osteosíntesis de  
fracturas**

TESIS DOCTORAL

Carmen María Iglesias Urraca

2015

### **Directores**

Dra. María Lorenza Escudero Rincón

Investigador Científico de OO. Públicos de Investigación .  
Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas (CENIM).  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Dr. Juan Carlos Rubio Suárez

Jefe de Sección de Cirugía Ortopédica y Traumatología  
Hospital Universitario La Paz.

### **Tutor**

Dr. Enrique Gómez Barrena

Catedrático de Cirugía Ortopédica y Traumatología  
Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid.



A mi familia



**Agradecimientos**

---





Una vez finalizado este trabajo, es inevitable mirar atrás y darse cuenta de que sin el esfuerzo personal y la dedicación de un montón de personas no hubiera sido posible. Muchas colaboraron de una manera directa y muchas más de manera indirecta, con su apoyo incondicional. A todas ellas mi más sincero y cariñoso agradecimiento.

En primer lugar a mis directores de tesis. Ellos me pusieron en contacto con un mundo apasionante muy alejado de mi experiencia clínica diaria como médico, el de la investigación. En mi depositaron su confianza y me aceptaron en su grupo de trabajo. Les tengo que agradecer sobre todo su paciencia, y dedicación a lo largo de estos cinco años, además de su motivación y perseverancia.

También quiero agradecer a la Dra. Cristina García Alonso y a todo el personal del CENIM por haberme recibido y acogido durante todo este tiempo, por todo el trabajo que realizaron para el estudio y por todo lo que me enseñaron. De igual modo a las Dras. Rosa Lozano y Blanca Pérez Maceda del CIB por su dedicación y apoyo. Formáis parte de un gran grupo tanto profesional como personal. Gracias por vuestras enseñanzas, vuestra dedicación y por esos momentos de descanso en los que hemos compartido una sonrisa.

A mi compañero de fatiga Oscar Bodelón con quien comparto alguna parte del trabajo, sobre todo por su complicidad en los momentos en los que el trabajo se estancaba, pero también por su paciencia en la realización de la estadística de todo el trabajo. Creo que en algún momento has llegado a odiar mis correos.....

Quiero agradecer el trabajo de radiología a todo el personal del Centro de Apoyo a la Investigación, (CAI) de RMN y RSE de la Universidad Complutense, particularmente a la Dra. Mercedes Delgado, al Dr. Luis García y al Dr. Miguel A. Pozo.

A la Dra. Carlota Largo, por sus enseñanzas y su confianza en el proyecto, su paciencia con ese entrar y salir de ratas. También al resto del personal del laboratorio,

por su dedicación y buen humor. Formáis parte de un grupo entrañable que me hizo disfrutar de todos los momentos que estuve en el laboratorio.

A la Dra. Celia Clemente, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares de Madrid, por su trabajo con las muestras de histología.

Al Dr. Norberto Malpica de la Facultad de Informática de la Universidad Rey Juan Carlos, por su paciencia y trabajo en el análisis de los datos de las imágenes radiológicas.

Al CENIM y al CSIC por el apoyo institucional que me concedieron.

Me gustaría agradecer con un cariño especial a mis amigas Mercedes, Pepa y Ana, porque vosotras sí confiasteis en mí y me ayudasteis en los momentos más difíciles. Gracias por animarme, aconsejarme, entenderme y escucharme.

Y cómo no, a mi familia, porque siempre estáis a mi lado, aunque a veces sea difícil. Mamá, gracias por enseñarme a luchar por las cosas en las que crees con ilusión y perseverancia y a ser fiel a mis ideas y a mí misma.





La osteosíntesis de las fracturas precisa de materiales que sean lo suficientemente rígidos como para poder mantener la reducción de la misma a la vez que unas características mecánicas lo más parecidas al hueso para evitar los fenómenos de apantallamiento frente a la carga. Una vez consolidada la misma, la presencia del material es innecesaria.

Los materiales de osteosíntesis biodegradables son por ello objeto de estudio. Sólo los polímeros han demostrado en la práctica clínica su utilidad en fracturas de huesos no sometidos a carga. Si bien, éstos poseen la cualidad de la degradación, sus propiedades mecánicas son bastante insuficientes y se han descrito reacciones alérgicas secundarias a ellos.

Es por eso que se comenzó con el estudio del magnesio. El magnesio es un metal con unas propiedades mecánicas muy similares al hueso y con la propiedad de degradarse en medios clorurados.

Si bien, posee dos problemas principales, su velocidad de degradación es muy rápida y al hacerlo produce gas.

El control de la velocidad de degradación fue el objeto de los primeros estudios de este trabajo que se realizaron *in vitro*. Esta puede modificarse según el tamaño de grano de material, sus impurezas, la forma de mecanizarse, la aleación con otros elementos así como el recubrimiento con otros productos químicos. Se probaron diferentes materiales Mg colado, Mg pulvimetalúrgico y AZ31 para comprobar sus propiedades físicas y la velocidad de degradación. Además se comprobó su biocompatibilidad en cultivos celulares. Tras estos estudios se decidió que el material más adecuado a nuestros propósitos era la aleación AZ31.

El siguiente paso fue corroborar que los hallazgos de laboratorio se reproducían en los animales de experimentación. Por ello se diseñaron tres estudios en animales. El primero para demostrar la biocompatibilidad del material en las ratas, el segundo para comprobar la velocidad de degradación en los fémures de las ratas y el tercero para comprobar si el material era capaz de mantener la reducción de las fracturas el tiempo suficiente para conseguir la consolidación de las fracturas.

Con el primer estudio *in vivo* concluimos que la velocidad de corrosión *in vivo* era mucho menor que la *in vitro* y que el material no producía reacciones a cuerpo extraño y era por tanto, bien tolerado.

El uso del material en el hueso demostró que su velocidad de degradación es todavía más lenta que en el tejido subcutáneo, lo cual favorecía los propósitos del estudio. Así mismo, la aleación AZ31 no sólo es bien tolerada por el organismo, sino que además posee unas buenas características osteoinductoras. Por otra parte la fractura se ha consolidado en el 100% de los animales en estudio manteniendo sus propiedades mecánicas durante todo el proceso de consolidación. El gas producido en el proceso de biodegradación de la AZ31 se intercambia y difunde rápidamente no alterando la formación ni la morfología del callo óseo. Existe un equilibrio entre la biodegradación de la AZ31 y la consolidación ósea que permite proponer el uso de la aleación AZ31 como material de osteosíntesis. No obstante una resorción del material mayor al 40% a los nueve meses obtenida en nuestros estudios, no permite afirmar que es suficiente como para propiciar la consolidación de huesos sometidos a carga.

Por último los niveles de trazas metálicas alcanzados a nivel sistémico, procedentes del proceso de biodegradación de la AZ31, no producen toxicidad en el modelo animal planteado.







## **1.-Introducción .....1**

*1.1.- Historia del material de implante. ....1*

*1.2.-Propiedades de un material de implante.....3*

*1.3.-Clasificación de los biomateriales.....5*

*1.3.1.-Permanentes y temporales.....5*

*1.3.2.-Respuesta biológica.....5*

*1.3.3.-Según su naturaleza.....7*

*1.4.-El por qué del magnesio.....12*

*1.4.1.-Historia del magnesio como implante.....13*

*1.4.2.-El magnesio y la biología.....18*

*1.4.3.-problemas del magnesio.....21*

## **2.-Hipótesis de trabajo.....37**

### **Objetivos.....41**

## **3.-Materiales y métodos. Plan de trabajo.....45**

*3.1.-Materiales metálicos.....45*

*3.2.-Animales de experimentación.....48*

*3.3.-Métodos.....49*

*3.3.1.-Ensayos de corrosión.....49*

*3.3.2.-Técnica localizada de sonda Kelvin (SKP) y espectroscopía*

de impedancia electroquímica.....	50
3.3.3.-Ensayos con cultivos celulares.....	51
3.3.4.-Ensayos <i>in vivo</i> .....	52
3.3.4.1.-Método quirúrgico.....	52
3.3.4.2.-Método histológico e histomorfométrico.....	56
3.3.4.3.-Método de evaluación de pérdida de peso.....	59
3.3.4.4.-Método radiológico: tomografía computerizada .....	59
3.3.4.5.-Método de medida de las trazas metálicas en los órganos.....	63
3.3.4.6 Método para el análisis de las trazas metálicas en los órganos.....	64
3.3.4.7.-Método estadístico.....	65

## **4.-Resultados.....69**

4.1.-Resultados de los estudios <i>in vitro</i> .....	69
4.1.1.- Caracterización de los materiales.....	69
4.1.2.- Comportamiento frente a la corrosión.....	74
4.1.3.- Análisis de la biocompatibilidad <i>in vitro</i> .....	80
4.2.-Resultados de los estudios <i>in vivo</i> .....	85
4.2.1.-Estudios de biocompatibilidad y biodegradación en calota.....	85
4.2.2.-Estudios de biocompatibilidad y biodegradación en fémur.....	92
4.3.- Validación en un modelo matemático.....	111
4.3.1.- Procedimiento teórico.....	111
4.3.2.- Ensayos <i>in vivo</i> .....	112
4.3.3.- Simulación matemática.....	114

<i>4.4.-Evaluación toxicológica y sistémica de los elementos metálicos biodegradados.....</i>	<i>115</i>
---	------------

<b>5.-Discusión.....</b>	<b>121</b>
--------------------------	------------

<b>6.-Limitaciones del estudio.....</b>	<b>149</b>
---	------------

<b>7.-Conclusiones.....</b>	<b>153</b>
-----------------------------	------------

<b>Bibliografía.....</b>	<b>157</b>
--------------------------	------------

<b>Anexos.....</b>	<b>179</b>
--------------------	------------

Publicaciones

Premio

Comunicaciones orales

Conflicto de interés

Becas y financiación







## **1.1 Historia del material de los implantes en medicina.**

El tratamiento de las fracturas es uno de los problemas médicos de los que primero tenemos evidencia. Los primeros datos fidedignos respecto a la aplicación de materiales en el tratamiento de las heridas datan de los siglos III y II a.C., pues se tiene constancia de que Hipócrates utilizó alambres de oro para las suturas. Posteriormente sólo se encuentran referencias en casos aislados. En 1546 Ambroise Paré describe el uso de placas de oro para reparar defectos traumáticos del cráneo y alambres de oro para contener las hernias abdominales. Icart en 1775 escribe sobre el uso de alambre en las fracturas. En esta época y durante un siglo aproximadamente, las fracturas se tratan con instrumentos de fijación temporal utilizados en la ferretería común como alambres de latón y chapas de hierro. Las infecciones con este tipo de materiales no tardaban en presentarse. El criterio para la selección del material se basaba más en su disponibilidad y resistencia mecánica que en su biocompatibilidad y resistencia a la corrosión en el cuerpo humano. El primer trabajo sobre la tolerancia de los implantes metálicos se debe a Levert, que en 1829 estudió el efecto de los implantes de platino, plata, oro y plomo en perros(1). El avance en otras ramas de la medicina logra mejorar los resultados en la cirugía, como fue el uso de los antisépticos en 1967 por Lister, en 1883 Pasteur introduce la técnicas de asepsia y en 1895 Roentgen, descubre los rayos X. Estos conocimientos dieron una nueva dimensión a la osteosíntesis al permitir el implante de piezas previamente esterilizadas y poder controlarlas posteriormente. Por esta época fueron diversos los trabajos llevados a cabo para intentar conseguir materiales adecuados para osteosíntesis. En 1909 Lambotte ensayó materiales metálicos como aluminio, plata, cobre, bronce, latón, etc. El resultado no fue el

esperado pues o bien eran blandos, o eran poco inertes y los productos de su disolución poseían efectos tóxicos. Es hacia el año 1930 cuando se consiguen las primeras aleaciones que reúnen las características adecuadas para su uso como material protésico o para la osteosíntesis de fracturas. Son las aleaciones de base cobalto y los actualmente difundidos aceros inoxidable<sup>(2)</sup>.



## 1.2 Propiedades de un material de implante.

El estudio de los biomateriales nos permite desarrollar implantes o dispositivos para el tratamiento de diversas patologías, de mayor calidad y mejor adaptados a las necesidades específicas de cada paciente y patología.

Un implante es un dispositivo colocado dentro o sobre la superficie del cuerpo con el objetivo de reemplazar funciones fisiológicas dañadas. Los implantes también son utilizados para suministrar medicamentos, monitorizar funciones corporales o proveer soporte a órganos y tejidos.

Un biomaterial debe de cumplir dos requisitos básicos: biocompatibilidad y biofuncionalidad. Ambos conceptos están estrechamente ligados a la respuesta bioquímica, electroquímica, superficial y mecánica del material en el cuerpo humano (3).

Biocompatibilidad es la capacidad de un material de ser utilizado en una aplicación específica con una respuesta adecuada del tejido receptor. Esta capacidad está caracterizada por la ausencia de una respuesta inflamatoria aguda o crónica durante su implantación e incorporación, así como a la carencia de efectos nocivos sobre los tejidos distantes tanto del material introducido como de las partículas e iones que se forman en la corrosión y desgaste del mismo (4).

Biofuncionalidad requiere que el material tenga las propiedades adecuadas para desempeñar la función para la que ha sido fabricado. En el caso de los materiales de osteosíntesis deben tener (5):

- propiedades mecánicas suficientes en el proceso de consolidación y remodelación ósea. En este caso, debe poseer un módulo elástico lo más parecido al del hueso (10-40 GPa),
- adecuada resistencia a las cargas cíclicas y por tanto alta resistencia a la fatiga,
- baja densidad,
- facilidad para su fabricación y reproducibilidad conforme a los requerimientos técnicos y biológicos,
- óptimo grado de osteointegración.

Es de suma importancia que los implantes cumplan con estas características ya que de otro modo limitarían su utilidad y confiabilidad.

## 1.3 Clasificación de biomateriales.

### 1.3.1. Permanentes y temporales.

La clasificación de los biomateriales puede ser muy amplia, pero si atendemos al tiempo de permanencia en el organismo se dividen en permanentes y temporales.

Los implantes permanentes tienen un periodo de vida de 15 a 20 años y tienen la función de reemplazar tejidos u órganos dañados, son el caso de las prótesis de uso habitual en ortopedia y de los implantes dentales.

Los implantes temporales sirven para reparar lesiones en tejidos y la duración de estos dependerá del tiempo necesario para la reparación de la lesión por el propio organismo (5).

### 1.3.2 Atendiendo a la respuesta biológica.

Ningún material es totalmente inerte dentro del organismo. Según la respuesta biológica que desencadenan en el organismo, se pueden clasificar como:

Biotolerables, que producen una reacción a cuerpo extraño mínima. Como por ejemplo los metales y polímeros (acero inoxidable, Titanio, Ti-Al-V).

Bioinertes, que producen una ausencia de reacción de los tejidos vivos en su contacto. Son ejemplo de ello la alúmina y la zirconia; son resistentes a la corrosión

y el desgaste y mantienen satisfactoriamente sus propiedades físicas y mecánicas en contacto con el hueso receptor.

Bioactivos, que son capaces de inducir, estimular, provocar o modular una acción biológica definida en el tejido receptor; es decir, es aquel material que posibilita una respuesta biológica específica en su relación con los tejidos. Un ejemplo es la hidroxiapatita. Una vez implantada forma con el hueso receptor enlaces muy fuertes y su superficie reactiva favorece el crecimiento óseo sobre la superficie del implante. La actividad osteoconductora de muchos materiales es dependiente de la precipitación del equivalente de apatita biológica en un electrólito fisiológico.

La respuesta tisular viene determinada por la capacidad de regeneración del tejido tras sufrir una lesión. La osteosíntesis supone una segunda lesión al traumatismo inicial ocasionado por la fractura y el propio material de osteosíntesis genera mecanismos de adaptación del organismo.

La osteointegración: Tras la agresión quirúrgica, el hueso tiende a regenerarse rellenando los espacios muertos alrededor del implante incluso entre las irregularidades de la superficie del mismo. Es decir, el hueso asienta al implante sin tejido fibroso interpuesto. Este fenómeno depende del hueso y no del implante y establece uniones de tipo mecánico entre ambos(2).

La osteoinducción: Es el fenómeno de formación de nuevo hueso por estímulo directo del material sobre los osteoblastos. Tiene lugar cuando el implante va recubierto de alguna sustancia bioactiva. Lo que sucede en este caso es una unión de

tipo químico entre el hueso y la superficie del implante al establecerse puentes de colágeno sobre los que se depositan cristales de fosfato cálcico (2).

### **1.3.3 Según su naturaleza.**

Existen dos grandes grupos de biomateriales, los orgánicos y los inorgánicos.

Los orgánicos están asociados a la ingeniería de tejidos, son materiales con un gran potencial dentro de la medicina regenerativa.

Entre los inorgánicos, caben señalar los materiales metálicos, los poliméricos, los cerámicos y los materiales compuestos, es decir, los que están constituidos al menos por dos de los materiales anteriormente citados; por ejemplo un material metálico con refuerzo polimérico.

En el área de materiales orgánicos se pretende desarrollar bien andamios tridimensionales acelulares que una vez implantados *in vivo* servirán para alojar las diferentes células, o bien, sobre estos andamios tridimensionales sembrar células progenitoras bajo condiciones *in vitro* que posteriormente son implantadas en el paciente con el fin de restablecer la función del órgano dañado.

Aunque es indudable la dimensión potencial de la ingeniería de tejidos, se mantiene el desarrollo de biomateriales que son inorgánicos pero que en principio han demostrado su capacidad de reparar *in vivo*.

Los materiales cerámicos son empleados en aplicaciones odontológicas y ortopédicas. Ejemplos típicos de estos materiales son la alúmina, la zirconia, los fosfatos cálcicos y ciertos vidrios. Estos materiales presentan altas temperaturas de

fusión, baja conductividad eléctrica y calorífica siendo duros y frágiles. La alúmina, considerada como material bioinerte, es muy resistente a la corrosión, no es tóxica y es muy biocompatible. Los fosfatos y los vidrios cerámicos son materiales bioactivos, los últimos avances consideran sustancias con actividad biológica en estructuras porosas de los cerámicos como el bioglás y los materiales mesoporosos.

La principal ventaja de los materiales cerámicos es su gran biocompatibilidad y su limitación más grande es su fragilidad y su baja resistencia al impacto, pudiendo dar lugar a fracturas frágiles en caso de impacto.

Los materiales poliméricos tienen una amplia variedad de aplicaciones en el campo de la medicina ya que presentan propiedades físicas, químicas y mecánicas más cercanas a las de los tejidos vivos que en su mayor parte están formados por polímeros naturales, como las proteínas y los polisacáridos. Además, son de fácil procesado y pueden obtenerse en diversas formas.

Actualmente existen numerosos polímeros utilizados en el campo biomédico. Algunos de ellos son estables, y son utilizados para aplicaciones permanentes y otros se utilizan en aplicaciones temporales.

Polímeros permanentes son:

- polimetilmetacrilato (PMMA), empleado como cemento en las articulaciones, rellenando el espacio entre implante y hueso.

- polietileno de ultra alto peso molecular (UHMWPE), que es inerte y con alta resistencia a los impactos y a la abrasión, lo que le hace ser el candidato idóneo para las articulaciones de prótesis, sobre todo de cadera y rodilla.

-poliacrilatos tienen excelentes propiedades de transmisión de la luz, por lo que se emplean en lentes intraoculares y lentillas.

Entre los polímeros reabsorbibles, destacan el ácido poliláctico (PLA) o el poliglicólico (PGA), principalmente empleados en suturas quirúrgicas y materiales de osteosíntesis (clavos, placas, tornillos, etc) (6).

Adicionalmente a estos materiales, se encuentran los copolímeros de poli- $\epsilon$ -caprolactona (6), polianhídridos, los poliortoésteres (7) y otros que actualmente se encuentran bajo investigación.

Sin embargo, el bajo módulo de Young y su naturaleza viscoelástica, han hecho que los polímeros hayan sido excluidos tradicionalmente de aplicaciones donde la carga ejercida sea un parámetro relevante. Además es difícil conseguir polímeros aptos para su empleo como implantes óseos que se hallen libres de aditivos que, bajo condiciones fisiológicas, puedan originar procesos alérgicos o toxicidad.

Los materiales metálicos son los únicos capaces actualmente de soportar cargas elevadas y los que ofrecen propiedades mecánicas más próximas a las del tejido óseo. Su alto módulo y límite elástico, su ductilidad y su resistencia a la fractura les convierten en el material de elección cuando el implante debe soportar cargas cíclicas (7) donde los requerimientos mecánicos prevalecen frente a los demás. Algunos metales han sido empleados como substitutos pasivos para reemplazar el tejido óseo, como las prótesis de cadera o rodilla, otros como ayuda en la consolidación de fracturas (placas, tornillos y clavos) y otros como implantes dentales. También han realizado funciones como “stents” vasculares, guías para catéteres, alambres ortodóncicos, implantes cocleares, etc (8,9).

La principal limitación de los materiales metálicos es que bajo condiciones fisiológicas tienen tendencia a biocorroerse y como subproducto de esa reacción, liberan partículas metálicas susceptibles de producir reacciones alérgicas y toxicidad sistémica (2,10).

Sin embargo, los dispositivos metálicos presentan también ciertos inconvenientes debido a sus altas prestaciones mecánicas; puesto que los materiales metálicos son más rígidos que el hueso ( $E_{\text{metal}} = 100\text{-}200 \text{ GPa}$ ;  $E_{\text{hueso cortical}} = 10\text{-}20 \text{ GPa}$ ), a menudo conllevan al fenómeno conocido como apantallamiento frente a la carga, “stress-shielding”, que es causado por esa diferencia de módulo entre el material y el tejido óseo (2,11). Esto trae como consecuencia la pérdida de masa ósea y la atrofia del hueso u osteopenia (12,13), lo cual debilita enormemente al hueso e incrementa el riesgo de fractura de éste e incluso del implante. Según la ley de Wolf-Roux (14), el hueso se remodela en respuesta a la carga. Por tanto, si la carga disminuye, el hueso se vuelve menos denso y más débil porque no hay estímulo para la remodelación continua que se requiere para mantener la masa ósea. Cualquier reducción en la rigidez del implante mediante el uso de un material con módulo elástico más bajo, mejora la redistribución de la tensión a los tejidos óseos adyacentes (15).

Tradicionalmente, en pacientes de edad no muy avanzada, es necesaria una segunda intervención quirúrgica para retirar este tipo de implante una vez que la fractura ha sanado (16).

En niños es también necesaria para permitir el normal crecimiento del hueso.



Los biomateriales más usados son: el acero inoxidable, las aleaciones de cobalto-cromo y las aleaciones de titanio. La tabla 1.1 reúne la comparación entre estos materiales y el tejido óseo (17).

PROPIEDADES	HUESO CORTICAL	Mg	Ti	Co-Cr	Acero inoxidable 316L	Hidroxiapatita
Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	1,8 - 2,1	1,74 - 1,84	4,4 - 4,5	8,3 - 9,2	8,0	3,1
Módulo de elasticidad (GPa)	3 - 20	41 - 45	110 - 117	230	193	73 - 117
Resistencia a la compresión (MPa)	130 - 180	65 - 345	758 - 1117	450 - 1000	170 - 310	600
Tenacidad a la fractura (MPa m <sup>1/2</sup> )	3 - 6	15 - 40	55 - 115	N / A	50 - 200	0,7

Tabla 1.1.- Comparación de propiedades físicas y mecánicas de materiales utilizados en los implantes actuales y el hueso

## 1. 4. El por qué del magnesio.

Los materiales metálicos, como los aceros inoxidables o el titanio y sus aleaciones, son los utilizados habitualmente como implantes para osteosíntesis, tanto en forma de placas y tornillos como de clavos endomedulares (18). Esta aplicación se debe a su elevada resistencia a la corrosión y su adecuada biocompatibilidad en el organismo. No obstante, estos materiales precisan de su retirada una vez producida la consolidación ósea y remodelación ósea. Este problema puede ser resuelto empleando implantes biodegradables y reabsorbibles, que gradualmente se disuelvan y eliminen. En la actualidad son muchos los materiales degradables utilizados, pero ninguno de ellos posee las características físicas y mecánicas de los materiales metálicos (19).

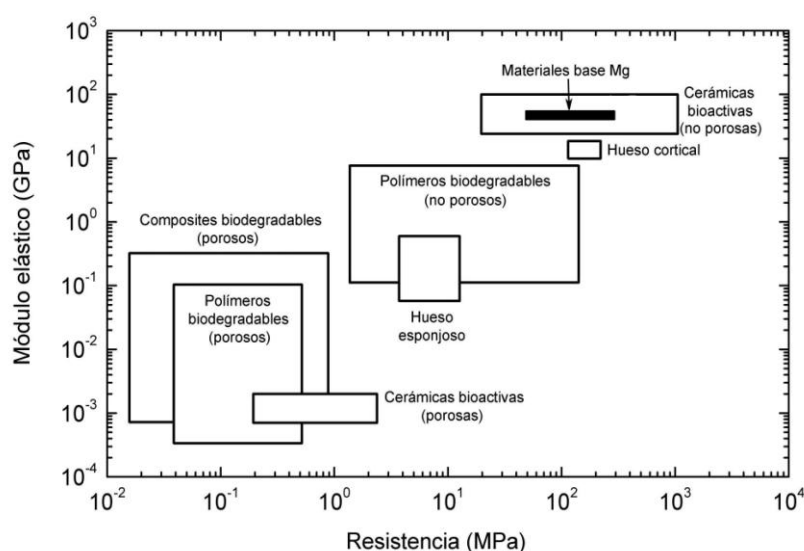


Figura 1.1. Propiedades mecánicas de distintos materiales en comparación con distintos materiales de base Mg

En este contexto, el magnesio (Mg) y sus aleaciones pueden ser biomateriales idóneos porque conjugan la capacidad de degradación con las propiedades mecánicas de los metales (11,20). Entre sus características, los valores de densidad ( $1,74 \text{ g/cm}^3$ ), módulo elástico de 44GPa a 20°C (21), resistencia a la compresión y la resistencia a cargas cíclicas del magnesio son más cercanos a los del hueso que la de los materiales empleados actualmente (tabla 1.1). Además, el magnesio es un elemento necesario para la incorporación del calcio al hueso y para la estimulación del crecimiento de nuevo tejido, lo que le hace particularmente apropiado para aplicaciones ortopédicas (22,23). No se le conoce toxicidad, se metaboliza por el riñón y se excreta por la orina.

El uso de materiales de base Mg ofrece, por un lado, las ventajas de una masa reducida, al tiempo que ofrece buenas propiedades mecánicas (24,25).

#### **1.4.1.-Historia del magnesio como implante**

La historia del uso del magnesio como implante biodegradable empieza poco después del descubrimiento del elemento magnesio por sir Humphrey Davy en 1808. Su asistente, Michael Faraday, consiguió la producción de metal de magnesio por electrólisis de la fusión anhidra de  $\text{MgCl}_2$  en 1833. La producción comercial de Mg mediante electrólisis se realizó por Robert Bunsen, en un pequeño laboratorio en 1852. En esta época se produce el magnesio en cantidades pequeñas y para un uso pirotécnico y, en forma de alambre, para la ignición de los flashes de las cámaras fotográficas (1). Es en 1878 cuando Edward C. Huse utiliza los alambres de Mg como ligaduras de vasos en humanos. Además él observó que la corrosión del Mg era más

lenta in vivo y que el tiempo hasta la completa desaparición del alambre dependía del tamaño del mismo.

Erwin Payr (26) fue quien realizó las primeras investigaciones usando el magnesio como biomaterial en tubos para anastomosis, placas y tornillos para la fijación de fracturas, prótesis articulares, clavos endomedulares en las fracturas de huesos largos, implantes en forma de flecha para tratamiento de los hemangiomas, etc. Las aplicaciones en las que más éxito obtuvo fueron el tratamiento de los hemangiomas y el diseño de clips y grapas para las suturas. En todas ellas la rápida degradación del material y la producción de gas en el proceso de corrosión del mismo, producía pocos efectos secundarios (27).

Para que se usara el Mg en aplicaciones ortopédicas hubo que esperar a que en 1907, Alain Lambotte (28) utilizara el Mg como una placa que fue fijada al hueso con tornillos de acero. Lo utilizó en un niño de 17 años con una fractura de tibia y peroné. Pero el uso de diferentes tipos de metales produjo una corrosión galvánica que hizo fallar el implante. Posteriormente estudió la corrosión del Mg como único material en pequeños roedores y comprobó su completa disolución a los 7 y 10 meses. Con estos experimentos realizó la osteosíntesis de fracturas supracondíleas de húmero con clavos y observó la completa disolución del material al año de haberlo insertado (29). Posteriormente Verbrugge (30) continuó los trabajos de su maestro y publicó buenos resultados con el uso de este material sin reacciones adversas a excepción de pequeñas burbujas de gas subcutáneo (31).

Ernest Hey Groves en 1913 estudió el uso de Mg intramedular en animales y no pudo reproducir los ensayos de Lambotte y Verbrugge. Observó una formación excesiva de callo de fractura y una degradación demasiado rápida de los implantes antes de conseguir la consolidación ósea (1).

En 1930 Earl McBride utilizó el Mg con aluminio (Al) y manganeso (Mn) para fabricar tornillos y pines para la osteosíntesis de fracturas. Él llegó a la conclusión de que las aleaciones de Mg no debían usarse en aquellas localizaciones anatómicas que precisaran de grandes requerimientos mecánicos. Además observó que la corrosión de los dispositivos colocados como placas y tornillos era más rápida que los colocados en el canal intramedular (32).

Durante otros estudios realizados, varios investigadores encontraron respuestas semejantes del material en el medio implantado. Por ejemplo, Payr (27) observó que los implantes mostraban superficies ásperas, picaduras de poca profundidad y cavitación a las 24 horas de la inserción del implante. A su vez, varios científicos observaron la aparición de burbujas de gas hidrógeno ( $H_2$ ), que se producían como consecuencia de la oxidación del Mg. Se creyó que este gas era la causa de la inflamación e infección ocurrido en los animales de experimentación. Por ello Troitski y Tsitrin en 1948 propusieron su uso en fracturas y heridas abiertas para que el gas formado pudiera desaparecer fácilmente. Ellos llegaron a la conclusión de que la cantidad de gas que se producía dependía de la velocidad de corrosión y del tamaño del implante así como de la acidez del medio en el que se encontraba.

<b>Autor</b>	<b>Año</b>	<b>Aleación de Mg</b>	<b>Aplicación</b>	<b>humanos/ animales</b>
<b>Huse</b>	1878	Mg puro	Alambres para ligaduras	Modelo animal/ humano
<b>Payr</b>	1892- 1905	Mg de alta pureza	Tubos, placas, alambres, varillas,...	Humanos, cobayas, conejos, cerdos y perros
<b>Höpfner</b>	1903	Mg puro	Cilindros para conectores de vasos	Perros
<b>Chlumsky</b>	1900-1905	Mg de alta pureza	Tubos, cilindros, arthroplastias	Humanos, conejos y perros
<b>Lambotte</b>	1906- 1932	Mg de alta pureza	Varillas, placas y tornillos	Humanos, conejos y perros
<b>Lespinasse</b>	1920	Mg puro	Anillos para anastomosis	Perros
<b>Groves</b>	1913	?	Clavos intramedulares	Conejos
<b>Andrews</b>	1917	Mg, Mg/Al, Mg/Cd, Mg/Zn	Alambres, clips para ligaduras	Perros
<b>Seeling</b>	1924	Mg puro	Alambres para ligaduras	Conejos
<b>Glass</b>	1925	Mg puro	Flechas	Humanos, ratas y gatos

Autor	Año	Aleación de Mg	Aplicación	humanos/ animales
<b>Verbrugge</b>	1933- 1937	Mg/Al6/Zn3/Mn 0,2	Placas, tornillos, clavos	Humanos, perros
<b>McBride</b>	1938	Mg/Mn Mg/Al/Mn	Placas, tornillos, clavos	Humanos, perros
<b>Maier</b>	1940	Mg	Alambres	Humanos y conejos
<b>Fontenier</b>	1975	Mg	Anodos implantables para las baterías de marcapasos	Perros
<b>Hussl</b>	1981	Mg puro	Alambres para tratamiento de hemangiomas	Ratas y conejos

Tabla 1.2. Resumen de la historia del magnesio como material en aplicaciones médicas.

El magnesio fue abandonado debido a sus pobres propiedades mecánicas y a la importante producción de hidrógeno gas durante los procesos de corrosión *in vivo*, procesos por otro lado que no ocurrían con otros materiales disponibles, como era el caso de los aceros inoxidables.

#### **1.4.2.-El Mg y la biología.**

El magnesio es el segundo elemento más abundante en la hidrosfera. Se trata de un elemento muy reactivo por lo que se encuentra sólo como un catión bivalente  $Mg^{2+}$  o bien formando sales o minerales. Es el 4º elemento más abundante del cuerpo humano (tabla 1.3), el catión intracelular que se encuentra en mayor proporción. Está envuelto en más de 300 reacciones enzimáticas conocidas. Además de su importancia en la formación de ATP, el magnesio juega un importante papel en la síntesis de proteínas, ácidos nucleicos, la actividad mitocondrial y la integridad de la membrana celular, contribuyendo a la modulación de los iones intracelulares y en los procesos de estabilización y traslación celular. Debido a su importancia en la homeostasis y sus potenciales efectos patológicos en la pérdida de su balance, es necesario conocer los efectos que este ion puede producir en el organismo humano tras su inserción como material de osteosíntesis (24,33,34).

El Mg se une a fosfatos y su presencia influye en la mineralización del tejido óseo a través del control de la formación de hidroxapatita.

El rango terapéutico para los suplementos de Mg es amplio y sus efectos secundarios son raros. El Mg junto con el Ca, Na y K es eficazmente controlado en el cuerpo a través de mecanismos homeostáticos y su toxicidad no es, en general, un problema.



Elemento	% del peso corporal
<b>Oxígeno</b>	65,0
<b>Carbono</b>	18,0
<b>Hidrógeno</b>	10,0
<b>Nitrógeno</b>	3,0
<b>Calcio</b>	1,5
<b>Fósforo</b>	0,8
<b>Potasio</b>	0,35
<b>Azufre</b>	0,25
<b>Sodio</b>	0,15
<b>Cloro</b>	0,15
<b>Magnesio</b>	0,05

Tabla 1.3.- Composición química del organismo

Como media un adulto de 70 kg tiene aproximadamente entre 21 y 28 gr. Más de la mitad de este magnesio se encuentra secuestrado en el hueso, el 35-40% en los tejidos blandos y menos de un 1% en el suero. Generalmente la dieta equilibrada mantiene estos niveles. El consumo recomendable de Mg en los adultos varones es de 420 mg/d y para las mujeres de 320 mg/d (35).

La absorción del magnesio ocurre primariamente en el yeyuno e íleo del tracto gastrointestinal. Una vez absorbido, se transporta por el sistema circulatorio a los lugares donde se precise. El flujo intra-extracelular del ion está estrictamente regulado para prevenir fluctuaciones intracelulares. El hueso es el reservorio natural de este ion desde el que se moviliza según las necesidades séricas. El riñón es el organismo regulador. El 80% del magnesio circulante es filtrado por el glomérulo y reabsorbido en su mayoría en la

porción ascendente del asa de Henle. Sólo entre el 3 y el 5 % del Mg filtrado se excreta por la orina. Si la concentración plasmática de Mg aumenta, o el riñón deja de funcionar, puede llegar a eliminarse el 100% del Mg filtrado. Un gran número de factores pueden alterar este proceso: la hormona paratiroidea, la calcitonina, la vitamina D y el glucagón.

La combinación de la regulación de la absorción intestinal, el uso del hueso como reservorio y la excreción renal, permiten mantener la homeostasis interna del Mg.

En algunas ocasiones esta homeostasis se rompe pudiendo dar lugar a hipo o hipermagnesemia.

### **Hipomagnesemia:**

**Primaria**, por alteraciones en la absorción intestinal de magnesio o por alteraciones en el aparato excretor (el riñón).

**Secundaria**, dieta pobre en Mg, medicamentos que promuevan la eliminación renal de Mg, el alcoholismo, la diabetes.

Consecuentemente se produce hipocalcemia, hipopotasemia, hiperexcitabilidad neuromuscular y alteraciones cardiovasculares como hipertensión arterial (HTA), arritmias e infarto de miocardio. Las deficiencias a largo plazo provocan arteriosclerosis, pre-eclampsia y osteoporosis.

**Hipermagnesemia:**

El uso de biomateriales de base Mg es más proclive a que exista un aumento del magnesio circulante. La causa más frecuente de hipermagnesemia es la reducción en la cantidad excretada por la orina. La rabdomiolisis que origina un fallo renal prerrenal es la más frecuente. Otras causas son iatrogénicas: inadecuada administración de suplementos para el tratamiento de la preeclampsia y su sobredosificación, aunque es muy poco frecuente, pero hace recomendable la monitorización sérica de este ion en estos tratamientos.

Los síntomas tempranos incluyen disminución de la presión arterial, náuseas y alteraciones mentales. Concentraciones más elevadas producen debilidad neuromuscular con debilidad progresiva que puede llevar a fallo respiratorio. La actividad cardiovascular también se ve alterada con hipotensión arterial, bradicardia y fallos en la conducción cardíaca.

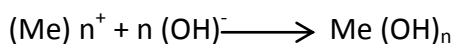
El tratamiento consiste en la reducción de la ingesta del mismo, promover la actividad renal o la diálisis si procede.

**1.4.3.-Corrosión del Mg en medios fisiológicos.**

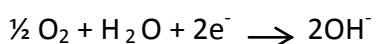
Un material metálico que sometido a la acción de un medio corrosivo, sufre un proceso de desintegración lento y paulatino liberando a los medios iones metálicos según el esquema: (36)



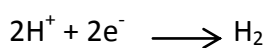
Este proceso es una auténtica oxidación. Los iones metálicos liberados pueden permanecer como tal o transformarse en, óxidos o hidróxidos siguiendo la siguiente reacción:



Paralelamente a esta reacción anódica, tiene que producirse una reacción catódica. Esta reacción viene dada, en medios neutros o alcalinos, por la siguiente ecuación:



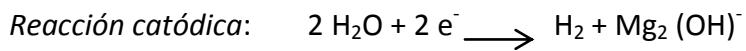
Y si el medio es ácido, la reacción de reducción será:



Debido a la neutralidad eléctrica de la materia, los procesos anódico y catódico se realizan al mismo tiempo pero en puntos distintos, quedando la corrosión circunscrita al ánodo. El equilibrio de cargas se consigue mediante una transferencia de electrones, quedando establecida una pila eléctrica.

En el caso del Mg el proceso de corrosión se puede desglosar en las siguientes reacciones que se presentan a continuación: medio acuoso clorurado produciendo hidrógeno gas y una alcalinización del medio.

La reacción de corrosión en los tejidos orgánicos generalmente aceptada para el Mg es:

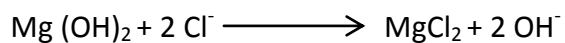


Según Song y cols. (37–39) se forma una capa protectora en la superficie, según la fórmula



La reacción general consume  $\text{H}^{+}$  y produce  $\text{OH}^{-}$  y por tanto el pH incrementa y desplaza la reacción a la derecha, es decir, a la formación de  $\text{Mg} (\text{OH})_2$ . (38–40)

El  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  reacciona con  $\text{Cl}^{-}$  para formar cloruro de magnesio altamente soluble, el cual se disuelve en el medio dejando expuesto el sustrato metálico al ataque del medio corrosivo. La reacción que se presenta corresponde al ataque por cloruros:



Como consecuencia, aparecen picaduras sobre el sustrato de magnesio, lo que acelera el proceso de corrosión (37)

Otro de los problemas que ocasiona que el Mg no fuera considerado como candidato para las aplicaciones biomédicas es la formación de hidrógeno gaseoso durante la corrosión del magnesio.

El coeficiente de difusión del hidrógeno (41), se incrementa exponencialmente con el incremento de la fracción de agua del tejido. Esto explica la razón por la que se observan diferentes velocidades de corrosión y de producción de gas en los diferentes lugares anatómicos en los estudios llevados a cabo por los diferentes investigadores.

Cómo y cuán rápido tiene lugar la reacción de corrosión depende de parámetros muy diversos que pueden ser:

- a) la composición de la aleación de Mg,
- b) los tratamientos metalúrgicos,
- c) el tipo de tratamiento de superficie,
- d) la composición electrolítica del medio en el que se encuentra,
- e) el pH del entorno y la capacidad del mismo para hacer de tampón,
- f) las necesidades mecánicas a la compresión y a la torsión,
- g) el entorno biológico como la presencia de proteínas y
- h) los fenómenos de transporte asociados con los reactantes o los productos de corrosión (37,39).

El comportamiento a la corrosión de las aleaciones de Mg depende en su mayoría del valor de pH, la capa superficial y el tipo y la distribución de las fases intermetálicas. Un pH >12 forma una capa que se autopasiva y es responsable de una alta resistencia a la corrosión. Un pH entre 10 y 11, vuelve la capa de pasivado

inestable. Con valores de  $\text{pH} < 9$  comienza la disolución activa y por ello se incrementa considerablemente la formación de hidrógeno (42).

El Mg sufre una disolución metálica activa en soluciones ácidas o en solución neutra sin depósito de hidróxido de Mg sobre la superficie. Esto aumenta el pH. El Mg sin protección expuesto a un medio corrosivo forma una película de hidróxido de Mg que disminuye la velocidad de corrosión. Esta capa es ligeramente soluble en agua, sin embargo la corrosión severa ocurre en ambientes fisiológicos acuosos. El hidróxido de magnesio reacciona con el ion clouro para formar un hidruro de magnesio altamente soluble, que se disuelve en el medio dejando expuesto el sustrato metálico al ataque corrosivo.

Las principales formas de corrosión del Mg son:

1.-Corrosión galvánica, es el metal más activo de las series galvánicas. Un implante de Mg es siempre un diodo activo si está en contacto con otros metales. Incluso la corrosión puede ocurrir entre la matriz y las partículas intermetálicas.

2.-Corrosión por picaduras. Por la microestructura de las aleaciones de Mg, en general, está caracterizada por una fase alfa-matriz y otra beta ( $\text{Mg}_{17}\text{Al}_{12}$ ) y otras partículas intermetálicas como  $\text{Al}_8\text{Mn}_5$ . Las picaduras son los lugares de iniciación de la corrosión por fatiga y tensión.

3.-Corrosión por fatiga, dicho fenómeno aumenta con la porosidad dado que los poros son siempre los sitios de nucleación de las grietas.

4.-Corrosión por erosión, la profundidad de las picaduras está afectada por la velocidad de impacto.

La corrosión es más compleja en el caso de las aleaciones de Mg que en el Mg puro. Está afectada por factores metálicos, los compuestos de la aleación y sus impurezas. En las aleaciones que contienen Al, la formación de alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) en su plano más interior puede frenar el proceso de la corrosión. (36,43)

Existen diversos factores que influyen en la velocidad de corrosión son:

1.- Elementos aleantes:

Una adecuada composición de un aleación puede mejorar la resistencia a la corrosión, las propiedades mecánicas y la facilidad de fabricación de los materiales de base magnesio. Los recubrimientos protectores y los tratamientos superficiales puede ser aplicados para mejorar potencialmente la resistencia a la corrosión, la compatibilidad biológica y la actividad biológica de los implantes.

La resistencia a la corrosión puede aumentar disminuyendo el contenido de otros elementos como Fe, Ni, Cu o Co o con la adicción de Zr, Ca, Sr o tierras raras. El Li puede disminuir la corrosión debido a que su degradación aumenta el pH a más de 11,5. Añadir Ca aumenta la resistencia a la corrosión en soluciones cloruradas y según su concentración, varía la velocidad de la corrosión de aleaciones binarias de Mg-xCa con distinto contenido en Ca ( $x=1-3\text{wt}\%$ ) y en diferentes condiciones de trabajo: colado, laminado y extrusión. La corrosión in vitro de  $\text{Mg}_1\text{Ca}$ ,  $\text{Mg}_2\text{Ca}$  y  $\text{Mg}_3\text{Ca}$  colado es



de 12,56, 12,98, 25,00 mm/a, respectivamente. El aumento en la concentración de Ca causa una disminución en la resistencia a la corrosión de las aleaciones de MgCa (16).

Las aleaciones de magnesio pueden ser divididas en tres grupos: magnesio puro con trazas de otros elementos, aleaciones que contienen aluminio y aleaciones libres de aluminio. Payr recomendó el uso de aleaciones, particularmente el magnalium, con el fin de mejorar propiedades y procesamiento del magnesio (1).

Las aleaciones de magnesio contienen aluminio, zinc y manganeso. El aluminio para endurecer y el manganeso para mejorar la ductilidad.

## 2.- La microestructura:

Es beneficioso obtener una estructura fina y homogénea. La solidificación rápida altera esta estructura.

Las esponjas que contienen 9,6-23,4% Al suprimen la fase  $Mg_{17}Al_{12}$ . La solidificación rápida disminuye la repasivación de las aleaciones MgAl y esta repasivación es superior para los metales que contienen más Al (42,44).

## 3.- La forma de procesamiento:

Existen diversas formas de procesar el Mg entre las que cabe destacar el procesado por vía colada y por vía pulvimetalúrgica (45).

**La colada** es un proceso de fundición del metal que se caracteriza por forzar el metal fluido a alta presión en una cavidad de molde.

El procesado **pulvimetalúrgico** crea un material poroso que favorece la rápida corrosión del biomaterial.

Procesos de **laminado en caliente y extrusión caliente** pueden reducir la corrosión de aleaciones de MgCa. La corrosión en aleaciones coladas, laminadas y extruídas de Mg<sub>1</sub>Ca es de 12,56, 1,63 y 1,74 mm/a, respectivamente, debido a la formación de una microestructura más fina que es el caso de los 2 últimos procesos de manufacturación. La degradación de Mg<sub>1</sub>Ca *in vivo* es mucho menor que en otros ensayos electroquímicos *in vitro* debido a la influencia de factores como la menor concentración de cloruros presentes en el plasma o en el hueso, la presencia de proteínas,...(44,46).

En el procesado en caliente, el calor puede alterar la microestructura y, por tanto, las propiedades de corrosión de las aleaciones de Mg. En general el procesado en caliente disminuye la corrosión de las aleaciones MgAl en soluciones cloruradas. Liu (47) estudia la influencia del tratamiento con calor (solución a 413°C durante 24 h seguida de envejecimiento a 216°C por 1, 5,5 y 12 horas) en la degradación de aleaciones coladas AZ63. La inmersión durante 14 días en un simulador de líquido corporal (Tyrode's) muestra que los ratios de corrosión son menores en casi la mitad sobre los no tratados. Es más, la variación en la microestructura altera la morfología de la corrosión: aparecen una corrosión filiforme y una corrosión en picaduras en los materiales envejecidos en contraste con la corrosión más profunda y uniforme de los materiales no tratados.

#### 4.- Influencia de la albúmina:

Las proteínas alteran la corrosión metálica, generalmente, por el cambio en los procesos anódicos o catódicos o ambos a la vez.

El  $Mg^{2+}$  reacciona con facilidad con la albúmina formando  $Mg(OH)_2$  que crece con rapidez en soluciones ricas en cloruros ( $Cl^-$ ) y sulfatos ( $SO_4^{2-}$ ). Esta capa de albúmina constituye una barrera de resistencia a la corrosión con altos valores de impedancia.

Las proteínas generalmente quedan adsorbidas en la superficie de los implantes a través de complejos procesos como enlaces de Van Der Waals, enlaces hidrofóbicos e interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno. La albúmina tiene un tamaño de  $42 \text{ \AA} \times 141 \text{ \AA}$  en solución con un peso molecular de 66 KDa. La concentración de albúmina en plasma es aproximadamente 50 g/l. El proceso de adsorción a las superficies supone un proceso de competición por los lugares de adsorción. Varias capas de proteínas adsorbidas se encuentran en los biomateriales metálicos. Esto puede inhibir el efecto del cambio de pH (48).

#### 5.- Influencia del pH:

El valor medio del pH tiene un importante impacto en la morfología de la corrosión. En general, la corrosión por picaduras se produce en medios neutros o alcalinos. Cuando el pH es mayor de 11,5, la corrosión es mucho mayor (49).

Por ello, se espera una corrosión acelerada porque el pH *in vivo* es de 7,5 en la sangre, 7,0 en el líquido intersticial y 6,8 en el espacio intracelular.

Con el fin de reducir el proceso de corrosión se han propuesto distintas estrategias para controlar la velocidad de degradación, que van desde la modificación del procesamiento metalúrgico del material (12), pasa por la variación del tamaño de grano (13), o bien la adición de elementos aleantes (50,51) o la aplicación de recubrimientos (52,53) y tratamientos de modificación superficial (54–56).

Las características mecánicas de los materiales son distintas en función de los componentes y de su forma de procesamiento. En un estudio previo ya publicado se analizó la importancia en la velocidad de corrosión del tamaño de grano y las distintas formas de procesamiento (13). Estos estudios se realizaron *in vitro* y se llegó a la conclusión de que la cinética de degradación según el procesamiento y el tamaño de grano de la aleación AZ31 no varía de forma estadísticamente significativa.

Por eso, mediante la modificación de su superficie (57) y su aleación con otros elementos (58) se pretende mejorar las propiedades mecánicas y la corrosión (59). Sin embargo, la velocidad de disolución del metal es mayor que la de regeneración del tejido, por lo tanto es necesario desarrollar una aleación biocompatible y reabsorbible con una velocidad de degradación controlada (11). Si bien existen numerosos trabajos sobre corrosión relacionados con la aplicación industrial de las aleaciones del magnesio, no se sabe mucho acerca de su comportamiento en las condiciones fisiológicas (60). En particular, existe una gran controversia con respecto a los resultados obtenidos en los trabajos publicados al respecto sobre la corrosión *in vitro* e *in vivo* de las aleaciones de magnesio (36,61–63). Muchos estudios muestran que la velocidad de corrosión *in vivo* es significativamente menor que los estudios *in vitro*, sin

saber muy bien cuáles son los parámetros que controlan esta cinética de corrosión *in vivo* (64).

Las aleaciones de Magnesio con adecuadas composiciones pueden mejorar la resistencia a la corrosión, las propiedades mecánicas y la facilidad de fabricación de materiales de base magnesio (16).

Elemento aleante	Ductilidad	Dureza	Resistencia a la corrosión
aluminio	+	+	
calcio	+		
hierro			-
manganeso	+		+
níquel			-
zinc	+		
zirconio	+		

Tabla 1.4.- Principales elementos aleantes y la influencia en las propiedades mecánicas del magnesio

La mayoría de los elementos aleantes pueden reaccionar con el magnesio o entre ellos para formar fases intermetálicas. Estas fases contribuyen a mejorar la resistencia por el método de endurecimiento por precipitación (tabla 1.4).

En general, los productos de degradación del Mg puro no presentan ningún efecto toxicológico importante. Sin embargo, cuando el Mg es aleado con otros elementos para formar las aleaciones, es necesario tener en cuenta el efecto toxicológico de los elementos aleantes del magnesio (65).

La composición química de las principales aleaciones de magnesio se expone en la tabla 1.5.

Aleación	Mg	Al	Zn	Mn	Si	Fe	Cu	Ca	Ni
<b>AZ31</b>	bal	3,0	0,7	0,4	0,01	0,003	<0,01	0,0014	<0,001
<b>AZ61</b>	bal	6,0	0,7	0,4	0,04	0,004	-	0,0013	-
<b>AZ91</b>	bal	9,0	0,7	0,2	0,04	0,002	0,005	-	<0,001

Tabla 1.5.- Composición química de las principales aleaciones de Mg

Casi todas ellas contienen entre un 1-10% de aluminio con trazas de zinc y manganeso. En la tabla 1.6 se expone la fisiología de esos elementos y su potencial toxicidad, como se puede ver en la tabla, el único elemento perjudicial al organismo es el aluminio (66). Es por ello que en un gran número de estudios se decidió investigar a la aleación AZ31 por su bajo contenido de Al. El aluminio como elemento aleante del Mg forma un compuesto intermetálico ( $Mg_{17}Al_{12}$ ) que puede liberarse en el proceso de degradación. Este compuesto es liberado por el aparato excretor.

El material biodegradable ideal debe proveer un adecuado mecanismo de fijación y una degradación parcial, también debe proveer la sustitución completa por un nuevo tejido. Es por esta razón que al recubrir el magnesio o a sus aleaciones, no se busca la resistencia total a la corrosión, sino una protección parcial para que el Mg se degrade a una velocidad adecuada para poder dar tiempo a la consolidación y remodelación ósea.

El Mg es por tanto un material con las propiedades mecánica más próximas al hueso que el resto de los metales y con la propiedad de degradarse y eliminarse sin efectos secundarios(67).

Elemento	Fisiopatología / Toxicidad
<b>Mg</b>	nivel sérico normal 0,73-1,06 mmol/l factor de crecimiento co-regulador metabólico estabilizador de ADN y RNA
<b>Al</b>	nivel sérico normal 2,1 - 4,8 microgramos/l factor de riesgo de Alzheimer daño fibra muscular daño a osteoclastos
<b>Zn</b>	nivel sérico normal < 0,8 micromol/l cofactor enzimático esencial para el sistema inmune
<b>Mn</b>	nivel sérico normal 2,1- 4,8 microgramos/ l importante en el metabolismo sistema inmune, crecimiento del hueso, cofactor de la regulación de la sangre y regulación de la energía celular

Tabla 1.6.- elementos químicos de las aleaciones y su fisiopatología.





**Hipótesis de trabajo**

---



Este trabajo pretende resolver la siguiente hipótesis:

¿Es posible obtener un material biodegradable, reabsorbible y con propiedades mecánicas parecidas a las del hueso, para poder ser utilizado en la osteosíntesis de fracturas de huesos sometidos o no a carga?.



**Objetivo**

---



El objetivo global de este trabajo de investigación es estudiar la biodegradación de materiales microestructurados reabsorbibles y multifuncionales de base magnesio, *in vitro* e *in vivo*, con el fin de conseguir un material adecuado para la osteosíntesis de fracturas, evitando así segundas intervenciones destinadas a la extracción del mismo.

El trabajo se llevará a cabo abarcando los objetivos parciales siguientes:

Estudios *in vitro*:

- 1.- Obtener de un material de base magnesio con *propiedades mecánicas* parecidas a las del hueso y valorar la cinética de corrosión *in vitro*
- 2.- Demostrar la *biocompatibilidad* en cultivos celulares.

Estudios *in vivo*:

- 3.- Estudiar la *biodegradación* y *biocompatibilidad* en calota de animales de experimentación.
- 4.- Analizar la *consolidación ósea* y *biodegradación del material* seleccionado en fémures de animales de experimentación. Para ello, se estudiará la influencia de distintas variables, como la presencia o no de fractura ósea, la modificación superficial del material de base magnesio, y el tiempo de experimentación.
- 5.-Elaborar un modelo *matemático* que justifique el proceso de biodegradación *in vivo*, considerando las principales variables que puedan afectar al proceso de biodegradación *in vivo*.
- 6.- *Analizar la toxicidad sistémica* procedente de la biodegradación de los elementos metálicos pertenecientes a la aleación de magnesio, AZ31.









### 3.1.- MATERIALES METÁLICOS

Los materiales de base magnesio objeto de estudios *in vitro* fueron los siguientes:

- a) Magnesio puro (99,8% de pureza) obtenido por vía pulvimetalúrgica y extruido a 420 °C.
- b) Magnesio puro (99,8% de pureza) obtenido por colada.
- c) Aleación de magnesio AZ31, suministrada por Elektron Ltd. en forma de chapa laminada de 3 mm de espesor en la condición “O-temper” consistente en un tratamiento de recocido a 345 °C, que equivale a un tratamiento de solubilización, por el cual el material de recepción no presenta la fase  $Mg_{17}(Al,Zn)_{12}$ .

#### Muestras cuadradas:

Para realizar los primeros ensayos *in vitro* e *in vivo* en calota de ratas se procesaron muestras cuadradas de dimensiones 10×10 mm<sup>2</sup> con un acabado superficial de desbaste con papel de lija de SiC para agua hasta grado 1200. Una vez lijadas las muestras fueron lavadas con etanol en baño de ultrasonido y secadas mediante chorro de aire.

#### Muestras en forma de clavo:

Para los ensayos *in vivo* en los fémures de las ratas se diseñaron y manufacturaron cilindros de 20 mm de largo y 1 mm de diámetro. Estas barras cilíndricas fueron desbastadas en su superficie con papel de SiC hasta grado 1200 y redondeadas en sus extremos con objeto de reducir las aristas vivas, que pueden modificar los procesos de corrosión, así como para facilitar su inserción.

Para revelar las características de la microestructura de las muestras, se atacaron con los reactivos siguientes:

- a) en el caso del Mg colado y Mg pulvimetalúrgico (PM), fueron sumergidas durante 2 minutos en una solución compuesta por  $\text{HNO}_3$  (1 ml), etilenglicol (75 ml) y completado con agua desionizada hasta 100 ml.
- b) la microestructura de la aleación AZ31 fue revelada utilizando una solución de etanol (100 ml), ácido pícrico (5 g), ácido acético (5 ml) y agua desionizada (10 ml) (13). El tamaño medio de grano se determinó mediante el método de intersección lineal (68).

Tras el ataque ácido, la caracterización microestructural de las distintas muestras (Mg colado, Mg PM y AZ31) se llevó a cabo mediante microscopía óptica (MO) utilizando un equipo marca OLYMPUS BH2. También se utilizó Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) con un equipo marca Phillips XL-30 para analizar la microestructura a mayores aumentos. La composición de las fases presentes se determinó usando el Espectrómetro de Energías Dispersadas de rayos X (EDS), equipo EDX DX-4i acoplado al MEB.

las microestructuras fue observadas con un microscopio óptico.

La porosidad de los distintos materiales se obtuvo según la norma ASTM E 562-99, mediante conteo puntual.

El comportamiento mecánico del material se caracterizó mediante la realización de ensayos de tracción en probetas planas de 10 mm de longitud útil y  $2 \times 4 \text{ mm}^2$  de

sección, con el eje de tracción paralelo a la dirección de laminación. Las muestras se ensayaron a una velocidad de deformación constante de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$  a temperatura ambiente.

Se llevó a cabo **una modificación superficial** de los materiales de base Mg en estudio, Mg puro (PM), Mg puro colado y la aleación AZ31 mediante un tratamiento de conversión química. Dicho tratamiento consistió en la inmersión de las muestras en una solución de ácido fluorhídrico al 48% con agitación a temperatura ambiente durante 24 horas (69). Una vez finalizado el tratamiento, las muestras se lavaron con agua destilada y se secaron mediante chorro de aire.

### 3.2.- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

**Animales de Experimentación.** Ratas Wistar hembras de peso medio 220 g.

Los animales se clasifican de manera aleatoria según los grupos a estudio.

**Condiciones de Estabulación.** La cirugía, mantenimiento y sacrificio de los animales se realizó en el laboratorio del Servicio de Cirugía Experimental del Hospital Universitario La Paz según los requisitos éticos y legales vigentes. Las ratas fueron mantenidas en jaulas de 6 ratas cada una según el grupo del estudio al que pertenecían. Todas las ratas fueron mantenidas en las condiciones ambientales regladas para estabulación de animales de laboratorio: 12 horas de luz y 12 de oscuridad, 20-24°C de rango de temperatura y un grado de humedad relativa en el rango de 55±10%.

**Normativas éticas y de bienestar.** Todas las ratas utilizadas en el estudio recibieron un trato digno, de acuerdo con la Directiva del Consejo de Europa publicada el 22 de septiembre de 2010 (2010/63/UE).

**Comité ético de bienestar animal.** El estudio obtuvo el permiso necesario para la experimentación animal en el comité de experimentación bioética animal (CEBA) del Hospital Universitario la Paz.

### 3.3.-MÉTODOS

#### 3.3.1. Ensayos de corrosión.

La evaluación de la velocidad de la corrosión, se llevó a cabo en los medios de ensayo que se detallan a continuación:

a) Disolución de PBS (Phosphate buffered saline): 8 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 0,2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1,15 g/L  $\text{NaHPO}_4$  de pH 7,4. La osmolaridad y concentraciones de iones de esta solución usualmente igualan a las del cuerpo humano (isotónicas).

c) Disolución de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementada con suero bovino fetal (FCS) (10% V/V) y con antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml).

La composición química de la disolución es:

- sales inorgánicas: 0,26 g/L  $\text{CaCl}_2$ , 0,40 g/L KCl, 0,20 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , 6,40 g/L NaCl, 3,70 g/L de  $\text{NaHCO}_3$  y 0,14 g/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

- vitaminas: 0,03 g/L.

- aminoácidos: 1,15 g/L.

- otros componentes: 4,50 g/L de glucosa y

- proteínas.

Este medio DMEM es el mismo que se utilizó en los cultivos celulares.

### ***3.3.2.-Técnica localizada de sonda Kelvin de barrido (SKP) y espectroscopía de impedancia electroquímica.***

El comportamiento frente a la corrosión se evaluó mediante sonda Kelvin de barrido (SKP) y medidas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS).

1) Los mapas del potencial superficial del Mg colado, Mg PM y la aleación AZ31 en estado de recepción y modificados superficialmente se obtuvieron mediante sonda Kelvin de barrido (SKP). Los barridos de potencial se realizaron empleando de una punta de Pt de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro, sobre áreas de  $3\times 3\text{ mm}^2$  a temperatura ambiente con una humedad relativa del 95%, obteniendo potenciales relativos al potencial del electrodo normal de hidrógeno (SHE).

2) Las medidas de espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) en función del tiempo se llevaron a cabo en una celda electroquímica convencional de tres electrodos, utilizando un alambre de Pt como contraelectrodo y un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia, siendo el electrodo de trabajo el material a estudiar.

3) Las medidas electroquímicas se realizaron en función del tiempo de inmersión en medios corrosivos aplicando una onda sinusoidal de potencial de 10 mV



de amplitud en un intervalo de frecuencias de 20 kHz a 1 mHz, tomando frecuencias espaciadas por cada década logarítmica.

Como electrolitos se emplearon los medios corrosivos anteriormente citados: PBS y DMEN. Las renovaciones del medio DMEN, se llevaron a cabo a las 24 horas de comenzar el ensayo y posteriormente cada 48 horas hasta la finalización del experimento, siguiendo así el mismo protocolo experimental que en los ensayos *in vitro* con cultivos celulares.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### **3.3.3.-Ensayos con cultivos celulares.**

Los materiales de base Mg (colado, PM y AZ31) a ensayar se esterilizaron con luz ultravioleta durante 5 minutos en una campana de flujo laminar.

Los cultivos *in vitro* se realizaron con dos líneas celulares de tipo osteoblástico: la línea de osteosarcoma humano SAOS-2 y la línea no tumoral de calvaria de ratón MC3T3-E1. Ambas líneas fueron cultivadas en DMEM suplementado con suero fetal bovino y antibióticos, que es el medio que también se utilizó para las medidas de corrosión. La concentración de células sembradas sobre los materiales de base Mg en estado de recepción y modificados superficialmente fue de 50.000 células/ml y 40.000 células/ml, para las líneas SAOS-2 y MC3T3-E1, respectivamente, en un volumen de 1 ml. La duración de los experimentos fue de 11 días para la línea SAOS-2 y 7 días para la

línea MC3T3-E1, tiempos en los que los respectivos cultivos alcanzaban la confluencia en ausencia de los materiales en estudio.

Durante los ensayos las muestras metálicas se observaron en la propia placa de cultivo mediante microscopio invertido y una vez finalizados los ensayos se observaron al microscopio óptico.

El crecimiento de células osteoblásticas se evaluó una vez fijadas las mismas sobre la superficie del material de ensayo. Para ello se añadió a cada pocillo de la placa 1 ml de metanol frío y se incubó a -20°C durante 10 minutos, seguido de un lavado con PBS y posterior incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente con 1 ml de una solución de 2 µg/ml Hoechst 33258 [28] en PBS. El reactivo Hoechst es un colorante que se une al ADN del núcleo celular y emite fluorescencia cuando es iluminado con luz ultravioleta, permitiendo visualizar la presencia de células. De esta forma, las muestras se pudieron observar en un microscopio multidimensional Leica AF6000 LX utilizando luz blanca y luz ultravioleta. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

### **3.3.4.-Ensayos in vivo.**

#### **3.3.4.1.- Método quirúrgico.**

**Protocolo anestésico:** para la intervención, cada rata fue anestesiada con una solución de ketamina (Ketolar®, 125 mg/kg), diazepam (Valium®, 10 mg/kg), y atropina (0,05 mg/kg) administrada por vía intraperitoneal. (0,5 ml de una solución con 2 mg de

ketamina+0,2 mg Dz + 0,01 mg atropina). En caso de precisar más tiempo quirúrgico se administran inyecciones de 0,1 ml de la misma solución

**Protocolo analgésico:** tras la intervención cada individuo recibió una dosis profiláctica de analgésicos y de antibióticos: 5mg de enrofloxacin (Baytril®, 5-10 mg/kg) en dosis única y Meloxicam (Metacam®, 2 mg/kg) en dosis única igualmente, por vía subcutánea.

**Protocolo de cuidados postoperatorios:** se reintrodujo la dieta líquida a las 4 horas y la sólida pasadas 12 horas tras la cirugía. Durante la primera hora postoperatoria cada espécimen permaneció en una jaula aislada. Una vez recuperada y comprobando la estabilidad de sus funciones vitales, la rata se introducía con las otras de su mismo subgrupo.

#### **Protocolo quirúrgico.**

##### *Ensayos de los métodos de esterilización.*

El proceso de esterilización mediante vapor de agua consistió en el calentamiento de las muestras a 134°C con un 100% de humedad durante 5 min.

El otro proceso de esterilización considerado fue mediante rayos gamma en una campana de vacío durante 5 minutos.

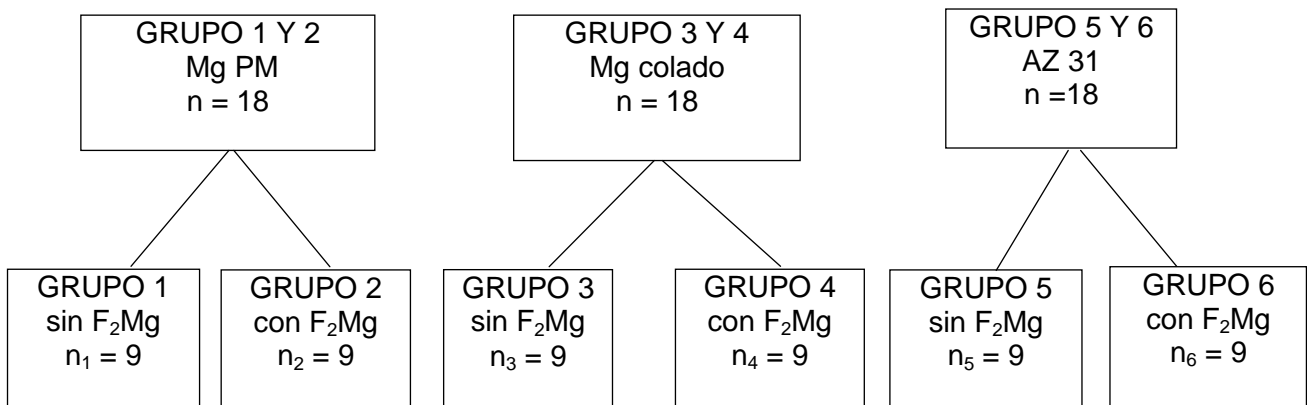
Ensayos en calota de ratas Wistar.

Se realiza una incisión sobre la sinóstosis biparietal, en la unión de ambos parietales, y se colocó la probeta en un plano subgaleal sin ningún tipo de fijación al mismo sólo dejando un bolsillo de periostio ajustado al tamaño del material.

Se ensayaron tres materiales (Mg colado, Mg PM y AZ31) en dos condiciones (estado de recepción y tratados superficialmente en ácido fluorhídrico), para tres tiempos (7, 30 y 48 días) y por triplicado.

En total 54 muestras.

n = 54



Sacrificio a 7, 30 y 48 días

Ensayos en fémur de ratas Wistar.

Se realizaron dos tipos ensayos. A unos animales se les introdujo el material en la cavidad intramedular sin realizar ninguna fractura, a otros se les realizó una fractura diafisaria de fémur.

ENCLAVADO INTRAMEDULAR SIN FRACTURA

Se coloca a la rata en decúbito supino y se realizó un abordaje anteromedial a nivel de la rodilla. Se talla un orificio de 1,1 mm con el punzón quirúrgico a través de la escotadura intercondílea, labrando un canal hacia el espacio intramedular femoral. Se inserta a través del mismo el implante descrito de forma retrógrada y en posición intramedular. Se procede al cierre de las artrotomías mediante sutura por planos con especial cuidado en el cierre de la cápsula articular que debe quedar herméticamente cerrada. Posteriormente se sutura el plano subcutáneo y la piel. Todas las suturas se realizaron con poliglicólico de 3/0.

ENCLAVADO INTRAMEDULAR CON FRACTURA

Con la rata en decúbito lateral se procede al rasurado y limpieza de la zona a operar. Se realiza un abordaje sobre la cara lateral de la pata de la rata. El abordaje de los planos musculares se realiza a través de las fascias sin necesidad de realizar ninguna sección muscular que haría especialmente dolorosa la recuperación del animal. Se realiza una osteotomía/fractura continua diafisaria a unos 10 mm de la interlinea articular. Para reproducir las condiciones fisiológicas de la fractura, esta se realizó mediante sierra de Gillies, dejando como patrón de fractura una oblicua larga

con mínima conminución. Se desliza el clavo endomedular por el canal medular distal y se reduce la fractura enhebrando el fragmento proximal con el clavo. Posteriormente se procede al lavado de la superficie ósea con suero fisiológico y cierre por planos de las heridas quirúrgicas, con material reabsorbible (Vicryl 3/0 para el plano muscular y de 4/0 para tejido celular subcutáneo y piel). El cierre de los planos fasciales fue especialmente cuidadoso para restaurar la anatomía *ad integrum*.(70)

Cada intervención tuvo una media de duración de aproximadamente 30 min.

**Protocolo eutanásico:** tras cumplir el tiempo determinado según el grupo y subgrupo, las ratas fueron sacrificadas mediante inyección intraperitoneal diluida en suero de 0,4 mg de pentobarbital sódico (Dolethal®).

**Método de obtención de muestras:** una vez sacrificadas, según el protocolo eutanásico, se extrajeron las siguientes estructuras:

- 1.fémur con cuádriceps femoral.
- 2.Hígado, riñones, pulmones, corazón, bazo y cerebro se conservan para realizar las determinaciones de trazas metálicas.

#### 3.3.4.2.-Método histológico e histomorfométrico

En los ensayos en la calota de los animales, se extrajo la cápsula que envolvía al material con el propio material en su interior. Posteriormente se procedió

a separar el material biológico para analizarlo histológicamente. El material metálico fue pesado y evaluado mediante técnicas de microscopía óptica en el CENIM.

Los fémures de las patas traseras izquierdas fueron extraídos, limpiados de tejido muscular y fijados en formaldehído al 10% (tamponado a pH 7), para ser deshidratados por inmersión en baños secuencialmente más concentrados de hidroximetil metacrilato, siguiendo el método de Donath y Breune. A continuación se cortaron en bloques y se incluyeron en resina Technovit®, a partir de la cual se obtuvieron secciones transversales o longitudinales de 50 µm de grosor con una sierra de banda de diamante Exact 312 y se pulieron con un equipo Exact 400 CS (Exact, Norderstedt, Germany).

En las secciones de 50 µm obtenidas se realizaron las tinciones histológicas de azul de toluidina y tricrómico de Masson. Para la tinción de azul de toluidina, se utilizó una variante que no requiere la retirada previa de la resina, que incorpora en su protocolo la utilización de hematoxilina de Weigert, y la posterior tinción con azul de toluidina a pH 4. El uso previo de la hematoxilina incrementa el efecto de la toluidina, con lo que los núcleos celulares aparecen en azul muy oscuro, casi negro. La sustancia intercelular queda claramente diferenciada en varios tonos de azul, dependiendo del grado de madurez del hueso.

El tricrómico de Masson hace posible la observación del tejido osteoide (no calcificado), que aparece teñido en color naranja, distinto del hueso maduro (calcificado), que se aprecia en verde. Los núcleos celulares se tiñen de rojo oscuro.

Una vez teñidos, los grupos de 5 cortes transversales, correspondientes a cada uno de los tiempos y condiciones del estudio, se fotografiaron mediante una cámara digital acoplada a un microscopio óptico. Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa informático MIP 4, con el que se calculó la diferencia entre el área original ocupada por el implante y el área que ocupa tras cada tiempo de implantación. Esta diferencia es la pérdida debida a su biodegradación (Figura 3.1).

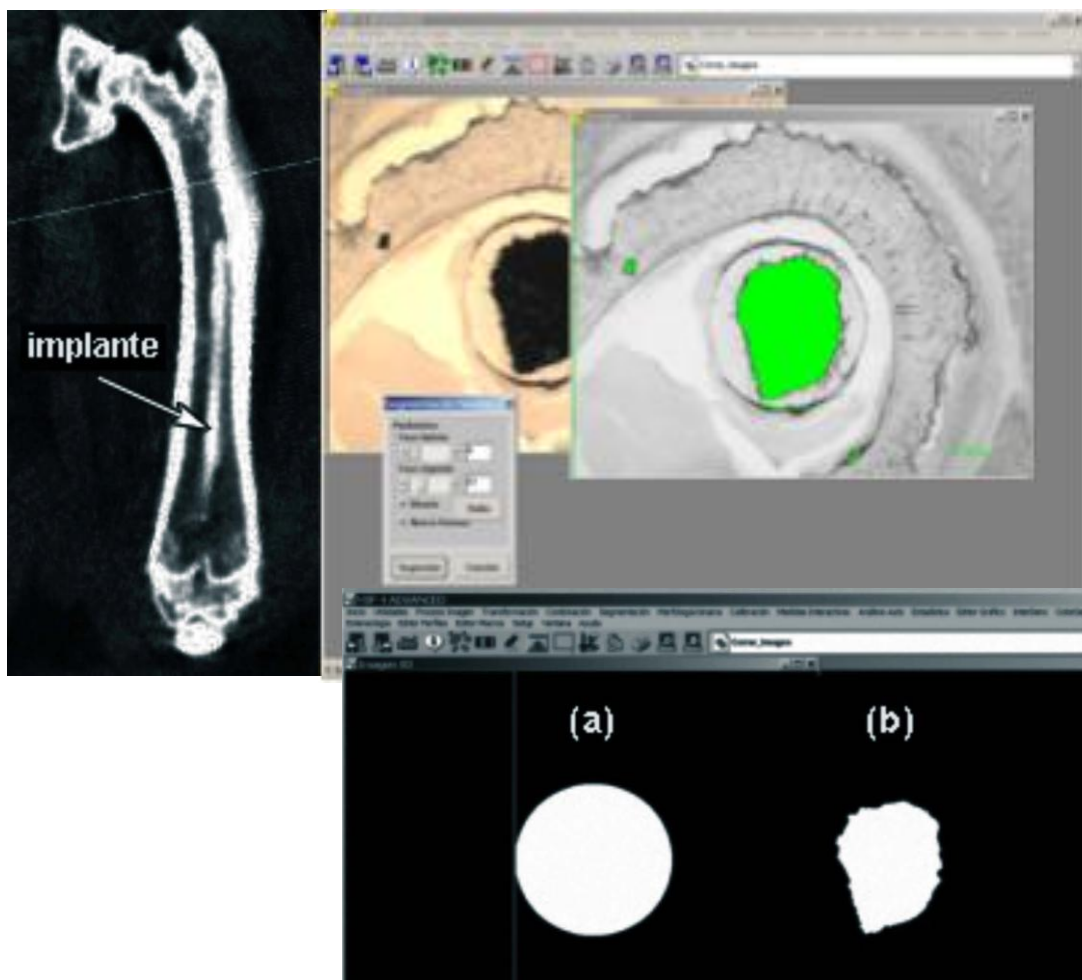


Figura 3.1.- Imagen del análisis histomorfométrico.



La histología e histomorfometría se llevo a cabo en el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Alcalá de Henares.

#### 3.3.4.3.- Método de evaluación de la pérdida de peso:

Esta técnica consiste en medir el peso de la muestra antes y después del ensayo de inmersión, por cierto periodo de tiempo. En el caso de las calotas, 7, 30 y 48 días. En este método debe considerarse la remoción de los productos de corrosión después de la inmersión ya que de no ser así podrían provocar errores en las mediciones.

El cálculo de la pérdida de peso se obtiene a partir de la fórmula (39):

$$\Delta w = (w_1 - w_2) / A \cdot d$$

donde Incremento de w es la pérdida de peso en mg/ cm<sup>2</sup> día

w<sub>1</sub> y w<sub>2</sub> representan el peso inicial y final respectivamente en mg

A es el área de la muestra en cm<sup>2</sup>

d es el tiempo en días

#### 3.3.4.4.-Método radiológico: tomografía computerizada

La evolución tanto de los implantes de AZ31 como de los fémures donde fueron insertados y fue seguida y estudiada, con el tiempo, mediante tomografía axial computerizada (TC).

Esta técnica se basa en la diferente capacidad de atenuación que presenta la materia al paso de los rayos X. A diferencia de la radiografía convencional que muestra un objeto tridimensional en una imagen bidimensional, la TC soluciona este problema escaneando cortes finos del cuerpo con un haz estrecho (gracias a la presencia de un colimador) de rayos X producidos por una fuente emisora que rota alrededor del mismo. La radiación que no es totalmente absorbida por el cuerpo es captada por un detector que se encuentra enfrenteado al tubo de rayos X y que gira simultáneamente con el mismo, obteniéndose una proyección. La intensidad con que la radiación se atenúa depende de la densidad del material que tiene que atravesar los rayos X, de manera que materiales más densos presentan una mayor capacidad de absorción a la radiación.

A continuación se produce el giro del conjunto fuente/detector en un pequeño ángulo, obteniéndose una nueva proyección. Finalmente, cuando se han completado 360°, se habrán obtenido todas las proyecciones posibles de esa sección.

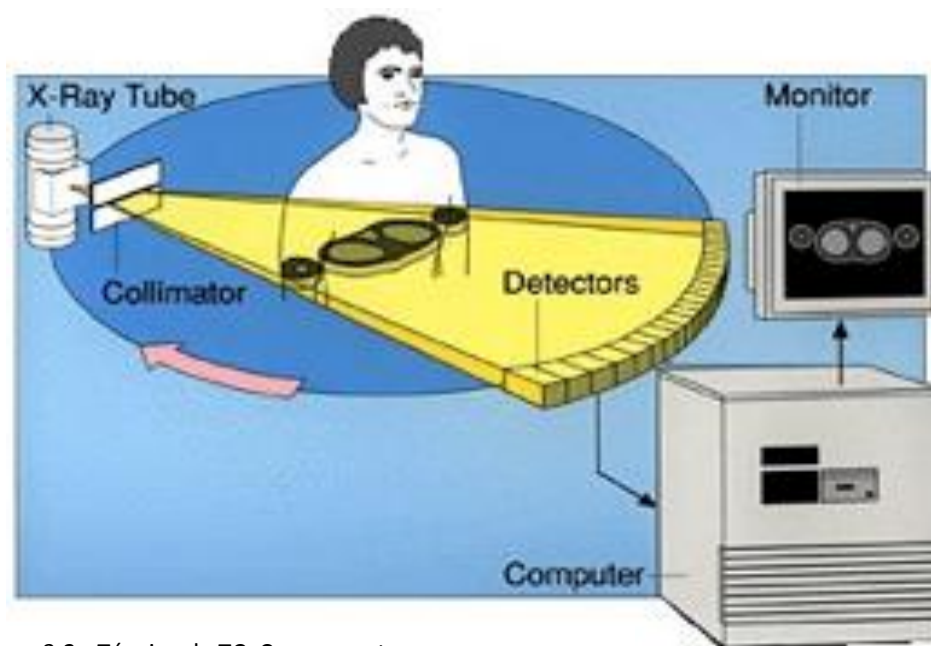


Figura 3.2.- Técnica de TC. Componentes.

Todos estos datos brutos son almacenados en un ordenador, que mediante la aplicación de algoritmos matemáticos (proceso de reconstrucción de la imagen tomográfica) origina la imagen tridimensional.

Con el fin de asegurar la inmovilización de los animales durante todo el proceso de adquisición tomográfica, los animales fueron anestesiados con una mezcla de isoflurano/oxígeno (5% de isoflurano durante el período de inducción; 2% en mantenimiento). A continuación los animales fueron colocados en posición decúbito prono en la camilla del escáner PET/TC (Albira ARS, Oncovision, España). Este equipo es un escáner híbrido PET/TC dedicado para pequeños animales (rata/ratón) que permite obtener imágenes PET, TC o PET/TC mixtas.



Figura 3.3.- Tomógrafo empleado en el estudio

El módulo CT del equipo Albira ARS presenta las siguientes características técnicas:

- Fuente de rayos X de 35  $\mu\text{m}$ , 50 kV máximo, 1 mA de corriente máxima.
- Area de vision (field of view -FOV-) de 64 x 64 mm,
- Resolución mínima de 90  $\mu\text{m}$ ,
- Detector de 2400 x 2400 pixeles.

Para la realización de nuestros estudios se especificaron los distintos parámetros con los siguientes valores:

- Calidad de la adquisición: 600 proyecciones/adquisición.
- Intensidad de radiación: 0,8 mA
- Voltaje de la fuente de rayos X: 45 kV.

Antes de iniciar la adquisición TC definitiva, se procedió a la obtención de una imagen preliminar planar (en 2 dimensiones) tomada a 0º, con el fin de asegurar la correcta colocación del fémur en el FOV del escáner.

Una vez adquiridas, las imágenes fueron reconstruidas mediante el algoritmo de retroproyección filtrado (filtered back projection -FBP-). Una vez reconstruidas, se obtuvieron imágenes tridimensionales con un tamaño de matriz de 512 x 512 x 512 pixeles, presentando un tamaño de pixel de 0,125 x 0,125 x 0,125 mm. Estas imágenes

fueron inicialmente visualizadas en el software Pmod (Pmod Technologies, Suiza), y salvadas en formato ANALYZE para su posterior análisis.

Esta imagen tridimensional fue segmentada a voluntad en áreas ocupadas por implante u ocupadas por gas, mediante el programa informático ITK-SAP (71) y sus respectivos volúmenes fueron calculados a través de la información sobre resolución contenida en el archivo de cabecera en formato DICOM, que es el estándar reconocido mundialmente para el intercambio de pruebas médicas.

Estos ensayos fueron llevados a cabo en el servicio interdisciplinar de la Complutense, en el Centro de Apoyo a la Investigación, CAI de RMN y RSE de la Universidad Complutense.

#### 3.3.4.5.-Método de medida de las trazas metálicas en los órganos

Después de 1, 9 y 13 meses respectivamente desde su inserción, se extrajeron los riñones, pulmones, hígado, bazo y cerebro de los animales empleando únicamente tijeras cerámicas (de óxido de circonio) y pinzas plásticas, para evitar la contaminación metálica de los órganos, que fueron entonces conservados a -20°C antes de ser trasladados al laboratorio, donde se disminuyó su temperatura hasta -80°C en un arcón congelador, paso previo para proceder a su liofilización, durante 72 horas, en un Benchtop 6K freeze dryer (VirTis, SP Scientific, New York, USA).

Una vez que las muestras habían perdido casi todo su contenido en agua, fueron reducidas a polvo y homogeneizadas empleando un molino de bolas de metacrilato (Ika Ultra-Turrax, Staufen, Germany).

Se tomaron alícuotas de cada muestra, se pesaron y se sometieron a una digestión ácida en un volumen de 50 mL (40 mL de agua destilada, 8 mL de  $\text{HNO}_3$  y 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) que se introdujo en vasos cerrados de alta presión del tipo HPV 80 a los que se procedió a calentar aumentando la temperatura lentamente hasta alcanzar los 200°C, empleando un microondas Ethos Sel 1600 URM (Milestone, Connecticut, USA). La digestión se efectuó durante 10 minutos a 200°C. Todos los resultados posteriores fueron normalizados respecto del peso de muestra empleada en la digestión.

#### 3.3.4.6.- Método para el análisis de las trazas metálicas en los órganos

Para identificar y cuantificar cada una de las trazas metálicas acumuladas en los órganos extraídos de las ratas, las muestras digeridas fueron analizadas en un espectrómetro de masas de acoplamiento inductivo, ICP-MS ELAN 6000 PE Sciex (Perkin-Elmer, Massachusetts, USA).

Se analizaron los siguientes elementos metálicos: Mg, Al, Zn y Mn. El último de ellos fue incluido porque proviene de la contaminación típica de estas aleaciones resultante del proceso de fabricación (65).

Como control se utilizaron tejidos y órganos obtenidos de ratas no sometidas a la inserción de implante, pero mantenidas, en el tiempo, en las mismas condiciones de estabulación que las ratas que sí los portaban.

El límite de detección, calculado en base a la desviación estándar de diez medidas sucesivas de la solución control, fue de 0,2 ppm (empleando el criterio de  $3\sigma$ ). La

precisión de la técnica en la cuantificación de Mg, Al, Zn y Mn se aseguró con la medida de un patrón certificado NIST de hígado.

#### 3.3.4.7.- Método estadístico

Los datos obtenidos fueron clasificados en diversos grupos según presencia o ausencia de fractura y de tratamiento con ácido fluorhídrico. Igualmente se clasificaron en función del tiempo de permanencia del implante y del órgano de procedencia. Se calcularon para cada uno de estos grupos la media y la desviación estándar (SD). Los test T de Student o el de Mann-Whitney fueron empleados para comparar la relación entre grupos independientes. La existencia de diferencias significativas entre pares de comparaciones fue establecida mediante ANOVAs, con corrección de Bonferroni, estableciéndose el nivel de significancia en el 95% de los casos ( $p \leq 0,05$ ). Para estos cálculos se empleó el programa estadístico SPSS v.19.

También se empleó el coeficiente de correlación de Pearson para estudiar el grado de relación lineal entre variables, conocido habitualmente como análisis de correlación, utilizando para su cálculo el mismo programa estadístico.

Los estudios en fémures de ratas se realizaron con los siguientes grupos:

Grupo control, 9 animales sin implante

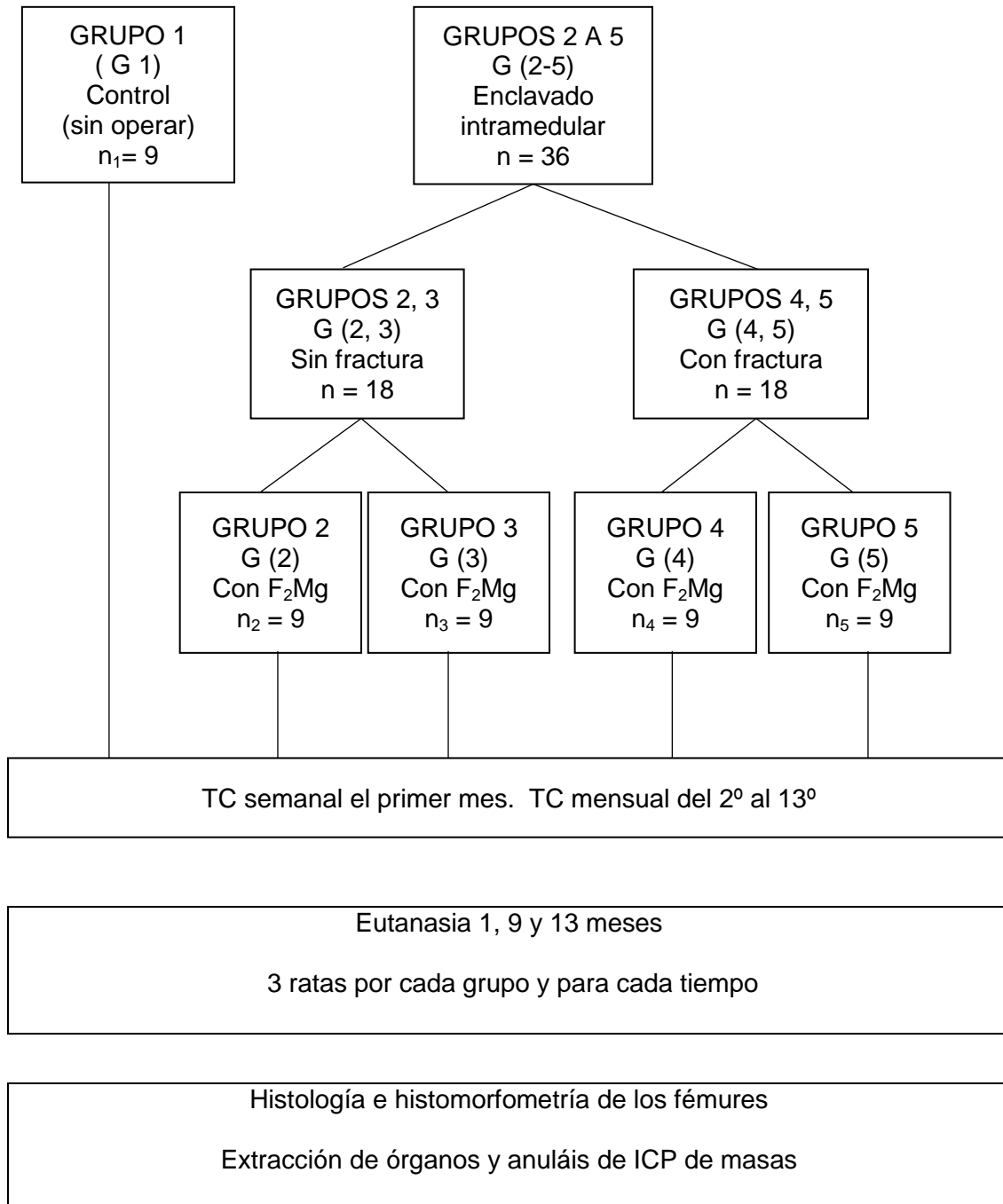
Grupo con implante, 36 animales

El material probado es AZ31 en 2 condiciones (con y sin fractura), para 2 estados ( de recepción y modificado mediante HF) y para tres tiempos ( 1, 9 y 13 meses).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado

## ESTUDIOS EN FEMUR DE RATA

n =45





**Resultados**

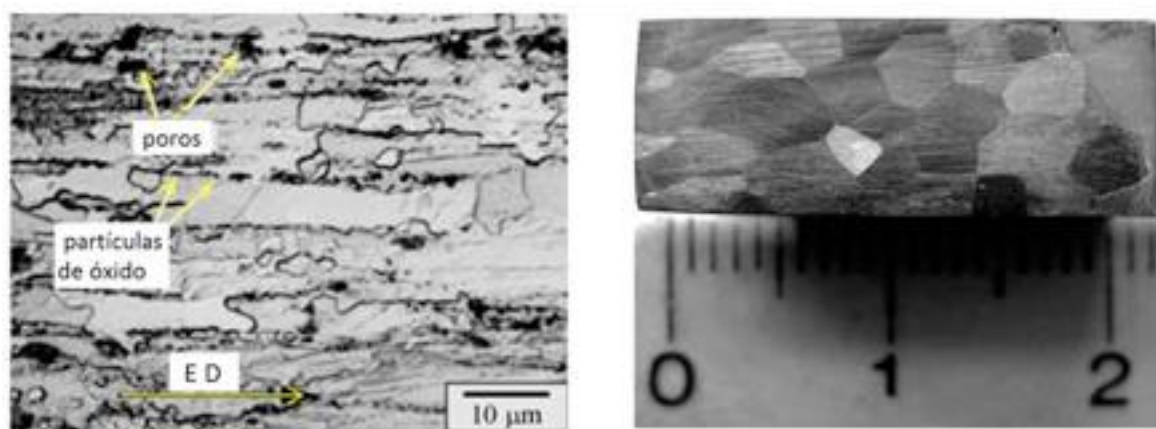
---



#### 4.1 Resultados de los estudios in vitro

##### 4.1.1.-Caracterización de los materiales de magnesio.

La figura 4.1. muestra la microestructura de los materiales de base magnesio estudiados: material de Mg procesado por vía pulvimetalurgia, Mg (PM) y magnesio



procesado por vía colada, Mg (colado).

Figura 4.1.- Microestructuras de Mg puro obtenida (izquierda) por vía PM y (derecha) por vía colada

Analizando las distintas imágenes, se puede observar cómo la microestructura del Mg PM muestra un refinamiento de grano obtenido por el procesamiento vía pulvimetalúrgica debido a una recristalización dinámica durante la extrusión en caliente. El tamaño de grano es heterogéneo alrededor de 5 µm o menor, con pequeñas partículas de óxido adheridas a los bordes de grano. Estas partículas proceden de la fractura durante la extrusión de la película que cubre el polvo original de magnesio (68). En la micrografía de la izquierda se pueden observar poros, los cuales son cavidades del proceso de compactado y de extrusión de los polvos. Estos

poros son característicos de este tipo de muestras. La fracción en volumen de porosidad es de 0,098, es decir un porcentaje del 9,8%. Este valor representa un porcentaje de porosidad bajo lo que facilitaría la disolución del mismo. La porosidad existente en el magnesio pulvimetalúrgico indica que existe una aportación de mayor área superficial, que es la suma del área de la matriz y del área de las cavidades de los poros, promoviendo un incremento en el área que será atacada por el medio corrosivo.

La microestructura del magnesio colado (foto derecha) muestra granos equiaxiales, otros alargados y unos más pequeños que otros (el rango del tamaño de los granos está en el orden de los  $\mu\text{m}$ ). Esta disposición diversa de granos indica que la muestra fue colada. Este tipo de muestra no presenta porosidad, ni impurezas, ni segundas fases, lo cual le hace ser en principio un material adecuado para aplicaciones biomédicas.

La micrografía de la figura 4.2, muestra la microestructura de la aleación de magnesio, AZ31. El tamaño de grano medio es 25,7  $\mu\text{m}$ . La microestructura presenta partículas de una fase rica en Mn ( $\text{Al}_6\text{Mn}$ ), cuya fracción en volumen, determinada mediante técnicas de análisis de imagen, se estima próxima a  $3 \times 10^{-3}$  (72).

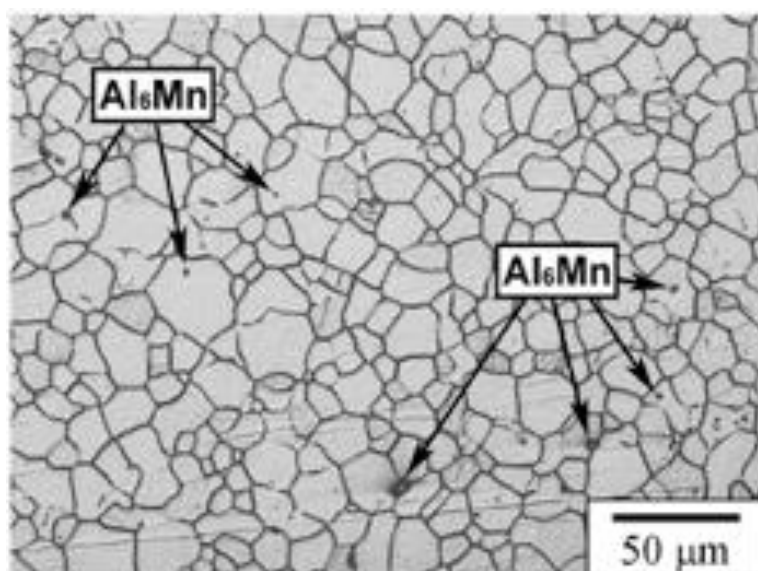


Figura 4.2.- Microestructura de la aleación de Mg AZ31

La composición química de las probetas de base magnesio puro en su forma pulvimetalúrgica y en su forma colada, así como la de la aleación AZ31 se determinó por análisis de espectroscopia de fluorescencia de rayos-X (WDXRF) y viene especificada en la tabla 4.1. Los elementos como el Fe y el Cu son extremadamente perjudiciales en la corrosión de los metales de base Mg pues condiciona una rápida velocidad de degradación. Aquellos materiales con mayores cantidades de Ca, sin embargo, tienen una menor velocidad de degradación.

	Al	Si	Mn	Fe	Ca	Cu	Zn	Mg
<b>Mg PM</b>	0,030	0,031	0,019	0,015	0,110	-	-	bal
<b>Mg Colado</b>	0,025	0,014	0,071	0,006	-	0,010	0,051	bal
<b>AZ31</b>	3,370	-	0,220	-	-	-	0,780	bal

Tabla 4.1.- Composición de las muestras de Mg puro y de la aleación AZ31

La modificación superficial de los materiales en estudio ( Mg colado, Mg Pm y AZ 31) se realizó en medio ácido en HF mediante técnica de conversión química. Dicho tratamiento da lugar a una capa de  $\text{MgF}_2$ . La figura 4.3 muestra como ejemplo un corte transversal en una muestra de AZ3. Se puede observar como la capa está firmemente adherida al sustrato con un espesor de unas  $3\mu\text{m}$ .



Figura 4.3.- Corte transversal de probeta de AZ31 recubierta. Imagen de la capa de  $\text{F}_2\text{Mg}$  mediante microscopio electrónico de barrido

El comportamiento mecánico a través de las curvas tensión-deformación de los materiales de magnesio, pulvimetalúrgico y colado así como el de la aleación AZ31 se muestra en la figura 4.4. Respecto al material AZ31, se muestran dos curvas de tracción correspondientes a la aleación con dos tamaños de grano (figura 4.3.b). De acuerdo con los resultados obtenidos se puede ver que la resistencia mecánica de las muestras de Mg (PM) se compara favorablemente con la aleación AZ31 y es muy superior a la de las muestras de Mg (colado). Asimismo, como es habitual en materiales pulvimetalúrgicos, se produce una disminución de la ductilidad en comparación con los colados.

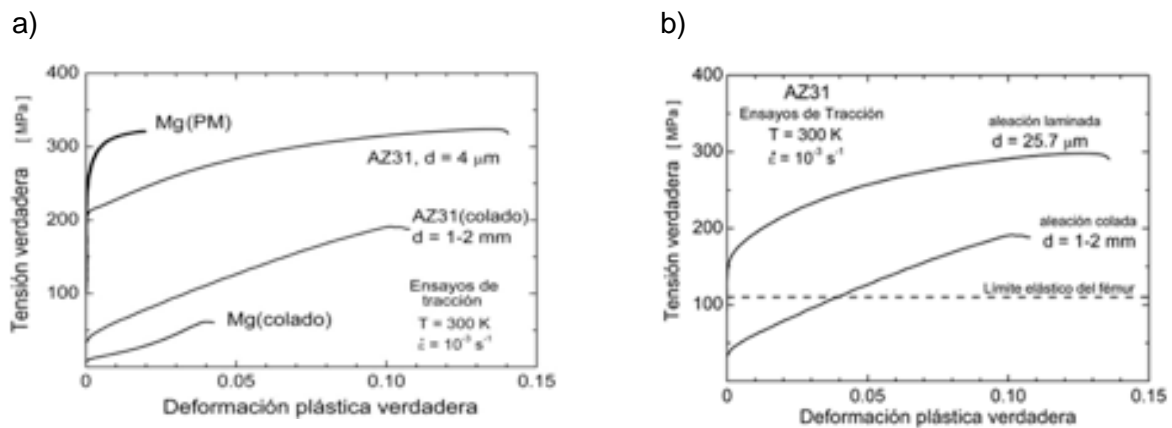


Figura 4.4.- Curvas de tensión -deformación de Mg PM, Mg colada y AZ31

Con el fin de comparar las propiedades mecánicas del hueso con los distintos materiales ensayados a modo de ejemplo la figura 4.4.b que muestra las curvas de tensión deformación de la aleación AZ31 elaborada por rutas distintas y con dos tamaños de grano diferentes y con respecto a las propiedades del hueso. Como se aprecia en la Figura 4.4.b, la aleación laminada, al poseer un tamaño de grano fino y una textura basal característica de la laminación [30], posee un límite elástico de 150 MPa (medido a una deformación del 0.2%) y una tensión máxima de 300 MPa, valores muy superiores a los alcanzados en el fémur (aproximadamente 100MPa de límite elástico).

#### **4.1.2.- Comportamiento frente a la corrosión de los materiales de magnesio en estado de recepción y recubiertos: evaluación de la cinética de degradación in vitro.**

La reactividad de la superficie de los materiales de base magnesio fue evaluada mediante SKP. En la figura 4.5 se muestran los mapas de potencial obtenidos después de 6 horas de exposición a un ambiente con humedad relativa superior al 95% tanto del Mg PM, como del Mg colado, desnudos y recubiertos con la capa de MgF. Los resultados de SKP demuestran que el Mg puro es electroquímicamente activo en ambientes húmedos como revela la electronegatividad de sus potenciales de superficie que se encuentran en el rango entre -0,4 y -0,1. Comparando Mg PM y colado, nos encontramos que el material colado tiene potenciales ligeramente mayores que el Mg PM.



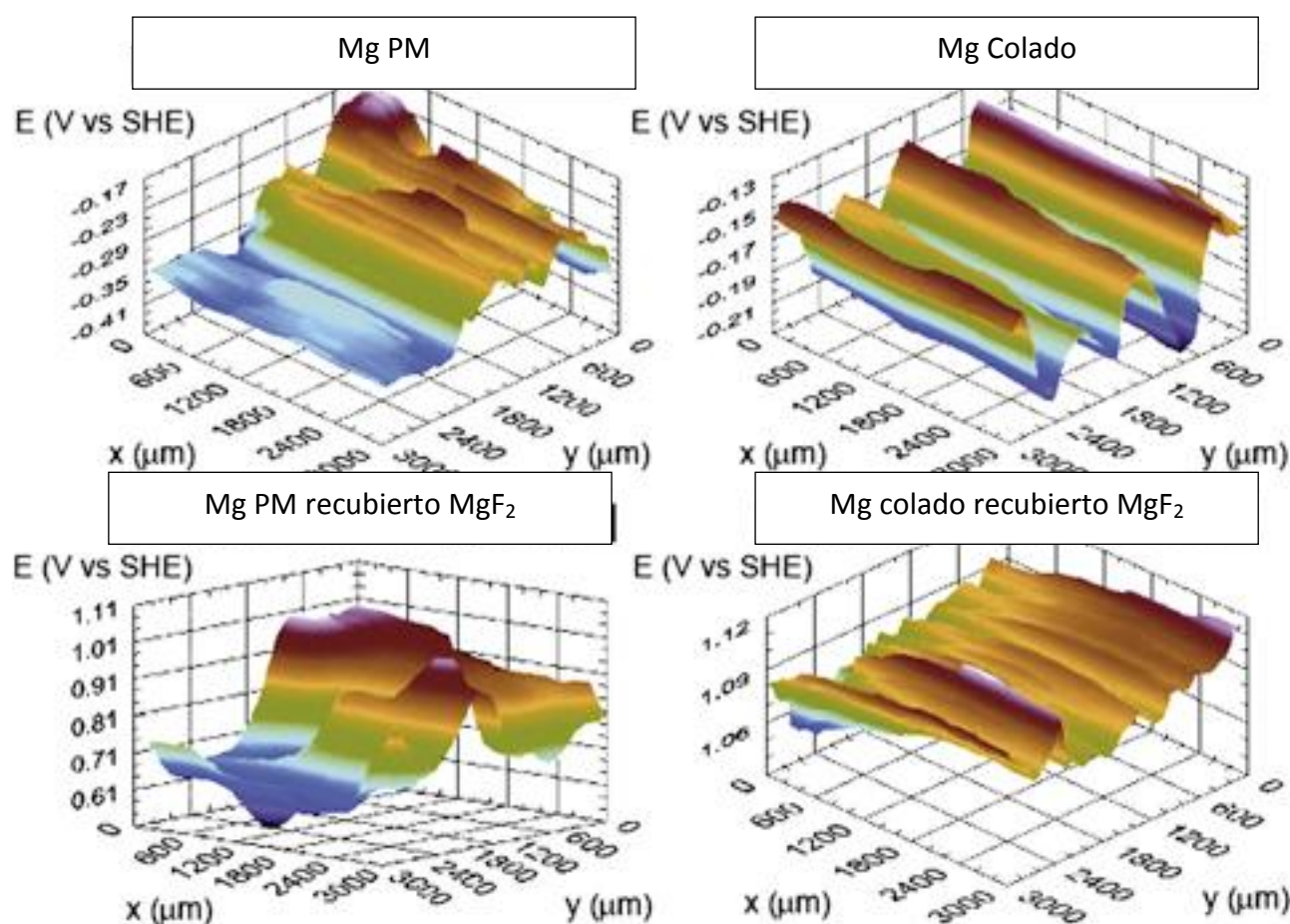


Figura 4.5.- Mapas de potenciales SKP después e 6 horas en ambiente con humedad del 95%

Por otra parte, en el material que ha sido recubierto, el potencial disminuye muy considerablemente, en el rango de 0,6 a 1,1. Estos resultados confirman el poder protector de la capa de  $\text{MgF}_2$  en la superficie del Mg. De nuevo el ennoblecimiento del potencial es mayor en el Mg colado que en el Mg PM.

La Figura 4.6. muestra los mapas de potencial de la aleación AZ31 en estado de recepción y modificada superficialmente, en las mismas condiciones ensayadas que el Mg colado o PM ( 6 horas de exposición y HR mayor del 95%). El mapa de potenciales muestra que el valor de potencial medio aumenta alrededor de unos 0,4 V tras el tratamiento con ácido fluorhídrico, lo que indica que la superficie del material AZ31

después de aplicar el tratamiento se ennoblesce, mostrando nuevamente el carácter protector de la capa de fluoruro de magnesio.

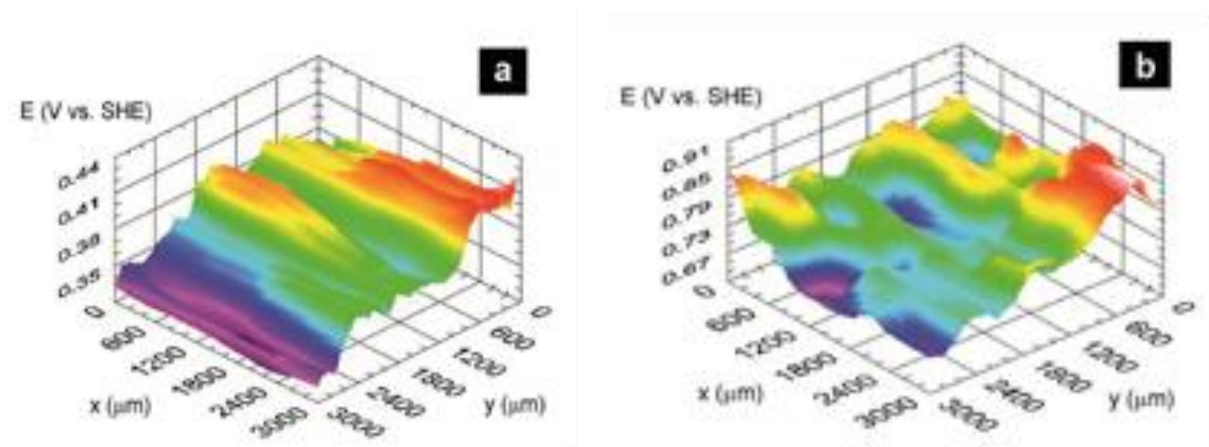


Figura 4.6.- Mapas de SKP para la aleación AZ31 sin capa(a) y con capa (b).

Después del estudio termodinámico, por SKP, de los materiales de base magnesio, se evaluó su cinética de corrosión en un medio fisiológico denominado DMEM, medio típico de cultivos celulares.

La realización de medidas de impedancia electroquímica (EIS) para diferentes tiempos de inmersión en el medio de cultivo celular, DMEM permitió evaluar comparativamente el comportamiento frente a la degradación de los materiales de base magnesio en estudio. La Figura 4.7 muestra los diagramas de Nyquist (representan la parte real frente a parte imaginaria de la impedancia) obtenidos tras diferentes tiempos de inmersión en DMEM para las muestras de Mg (PM), Mg (colado) y AZ31 en estado de recepción (Figura 4.7 ) y recubiertas (Figura 4.8 ).

En general, los diagramas de impedancia obtenidos muestran la formación de semicírculos capacitivos, asignados a la resistencia de transferencia de carga, o lo que es lo mismo, a la resistencia frente a la corrosión.

En lo que respecta al comportamiento de los materiales en estado de recepción (Figura 4.7), se observa que la aleación AZ31 presenta una resistencia a la corrosión en DMEM superior a la del Mg puro debido a la mayor estabilidad de la capa pasiva del material por la presencia de elementos aleantes en su composición. A su vez, el Mg (PM) presenta una resistencia a la degradación significativamente menor que el Mg (colado), un comportamiento derivado de la microestructura altamente heterogénea del material pulvimetalúrgico por la presencia de partículas de óxido y poros generados en el proceso de fabricación.

Al formar el recubrimiento protector sobre las muestras estudiadas (Figura 4.8) la amplitud de los semicírculos obtenidos en los espectros de EIS aumenta con respecto a los registrados para los sustratos desnudos, siendo especialmente significativo en las muestras de Mg (colado) y AZ31. De nuevo, el comportamiento observado en los materiales en estado de recepción se mantiene al aplicar el recubrimiento protector, ya que el Mg (PM) exhibe una baja resistencia frente al medio en comparación con el Mg (colado) y la aleación AZ31, siendo ésta última la que presenta el mejor comportamiento.

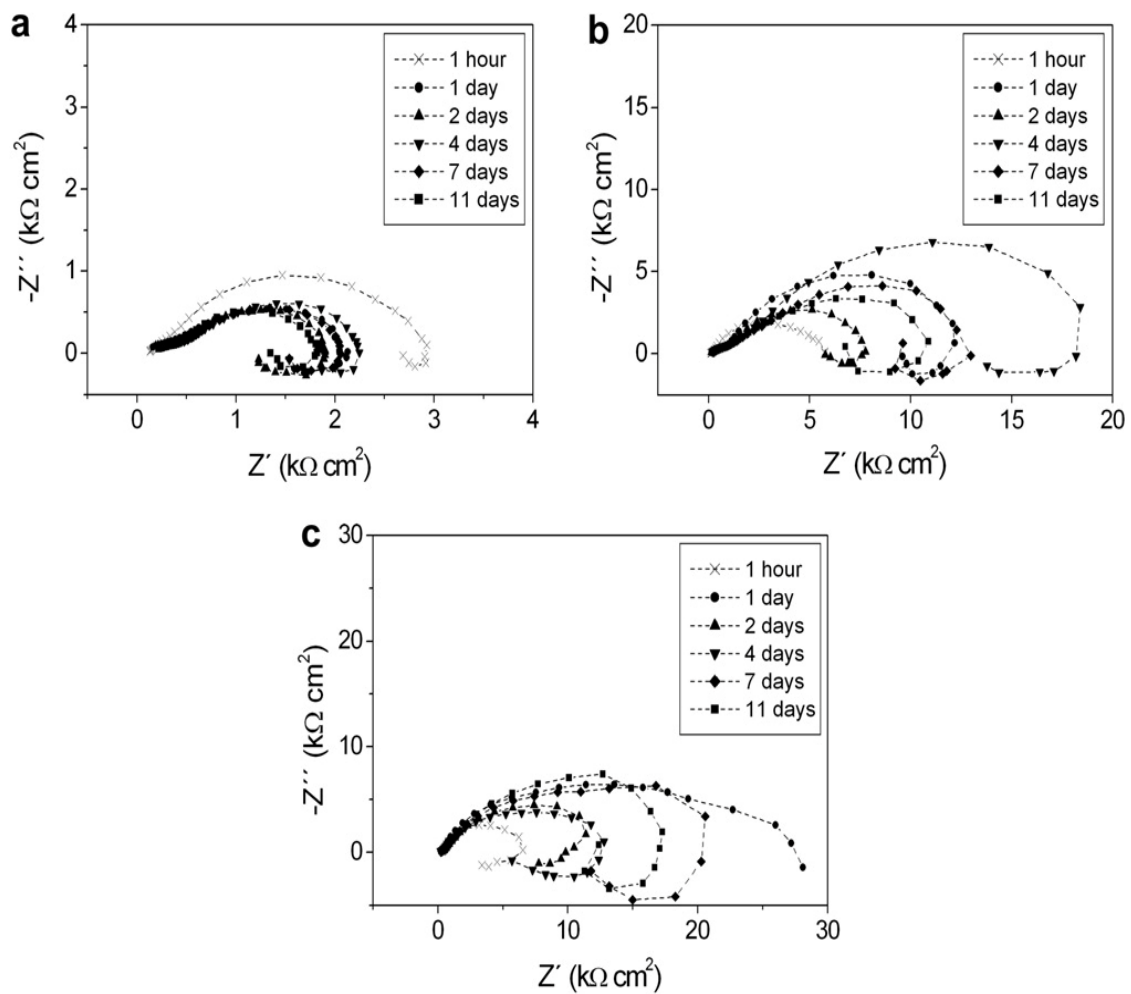


Figura 4.7.- Diagramas de Nyquist con el tiempo para a) MgPM, b) Mg colado, c) AZ31

Por comparación de los diagramas obtenidos puede deducirse que el tratamiento de conversión química en ácido fluorhídrico genera una capa de fluoruro de magnesio protectora que ralentiza el proceso de corrosión en medio fisiológico, especialmente cuando dicha capa se forma sobre los sustratos de Mg (colado) y AZ31. Como dato significativo, obsérvese que el diámetro de los semicírculos obtenidos para estos materiales recubiertos tras 11 días en el medio de cultivo celular (Figura 4.7) todavía sigue siendo superior al de los semicírculos obtenidos en estado de recepción tras sólo 1 día de inmersión (Figura 4.7).

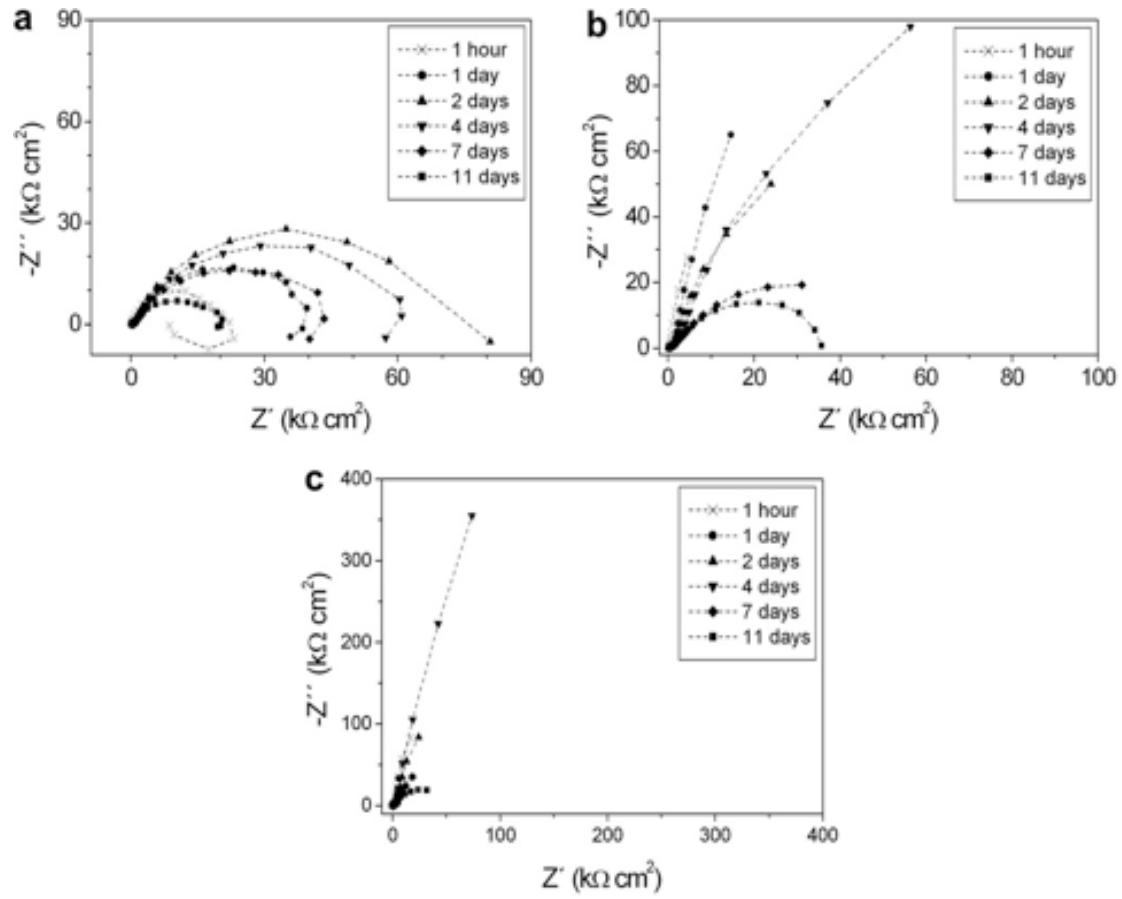


Figura 4.8.- Diagramas de Nyquist con el tiempo para a) Mg PM, b) Mg colado, c) AZ31 recubiertos con capa  $MgF_2$

#### **4.1.3.- Análisis de la biocompatibilidad in vitro de los materiales de Mg en estado de recepción y recubiertos.**

Los materiales de magnesio en estado de recepción fueron ensayados en medio de cultivo celular en presencia de células SAOS-2 y MC3T3-E1. A las pocas horas de exposición, de los materiales (con independencia de que fuese Mg PM, Mg colado o aleación AZ31) en los cultivos celulares de células SAOS-2, aparecía un gran desprendimiento de burbujas, hecho que se mantuvo durante todo el ensayo. Esta evolución de gas se producía como consecuencia de la liberación de hidrógeno (reacción catódica) durante el proceso de corrosión de los materiales de magnesio. Acompañando a esta evolución de gas se podía observar una abundante formación de un precipitado blanquecino en el pocillo de ensayo, precipitado que también recubría los materiales metálicos ensayados. Este precipitado es la consecuencia de la reacción de biocorrosión que sufren los materiales de magnesio, dando lugar a la formación de iones magnesio en forma de óxidos e hidróxidos. La presencia de estos óxidos e hidróxidos de magnesio justifica la ausencia de crecimiento celular observada y por tanto la falta de biocompatibilidad.

Por el contrario, la observación en el microscopio invertido de las muestras de magnesio modificadas superficialmente por el tratamiento de conversión química en ácido fluorhídrico mostró una clara disminución en la cantidad de precipitados formados en el medio de cultivo y la existencia de células en el pocillo. Más aún, la posterior observación bajo el microscopio óptico de las muestras de Mg (colado) y AZ31 extraídas del cultivo permitió claramente observar células bien adheridas y

redondeadas sobre la superficie de los materiales recubiertos. La Figura 4.12 muestra una imagen correspondiente a la aleación AZ31 con recubrimiento de fluoruro de magnesio ensayada 7 días en cultivos de células SAOS-2 en la que parece observarse un epitelio de células.

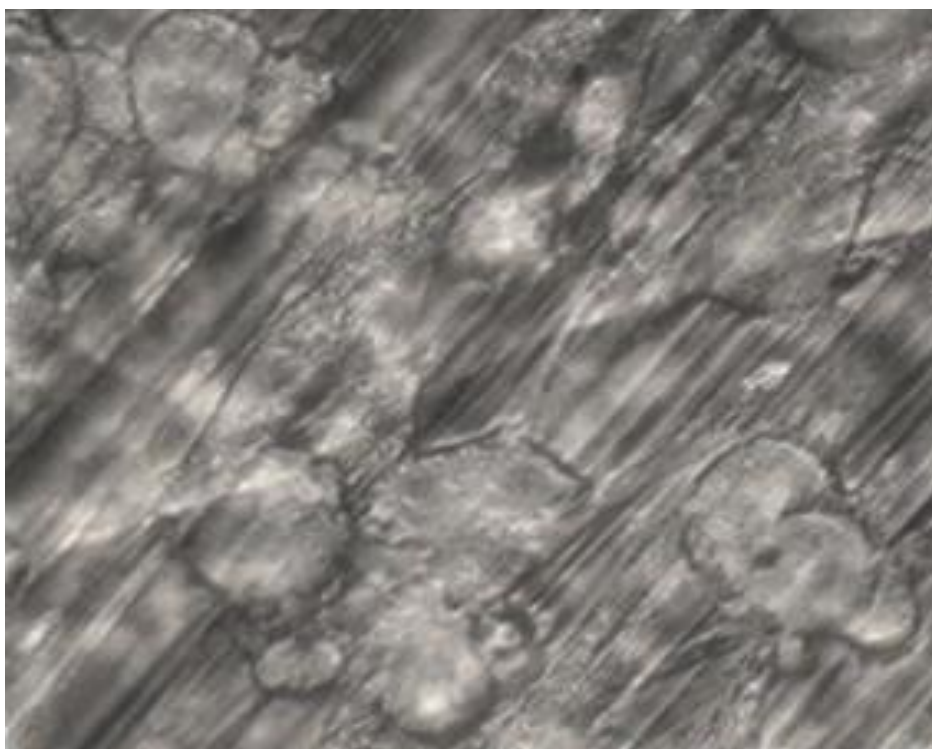


Figura 4.12.- Células osteoblásticas SAOS-2 adheridas a la superficie de la aleación AZ31 con recubrimiento de fluoruro de magnesio (500×).

Resultados similares fueron obtenidos a partir de los ensayos in vitro realizados con la línea celular osteoblástica MC3T3-E1. Como se observa en la Figura 4.13, la fluorescencia del reactivo de Hoechst 33258 permite visualizar la presencia de células adheridas sobre la superficie de los distintos materiales ensayados con recubrimiento de fluoruro de magnesio tras 7 días de ensayo. De los resultados obtenidos puede extraerse la buena biocompatibilidad del Mg (colado) y la aleación AZ31, ambos

recubiertos con fluoruro de magnesio, al permitir el crecimiento de células, no sólo en el pocillo sino también sobre la superficie del material metálico en estudio.

La caracterización superficial de los materiales después de su exposición al medio de cultivo celular, tanto en presencia de células como en ausencia de ellas, permitió determinar la magnitud de la degradación y la morfología del ataque producido, evidenciando la elevada agresividad del medio, la cual se debe fundamentalmente a su concentración en cloruros. Un ejemplo de ataque localizado se presenta en la Figura 4.14a), donde se observa la formación de numerosas picaduras sobre una muestra de Mg (colado) en estado de recepción tras 11 días de inmersión en DMEM. Comparativamente, la Figura 4.14b) muestra el menor grado de ataque producido en el material por efecto del carácter protector del recubrimiento de fluoruro de magnesio.



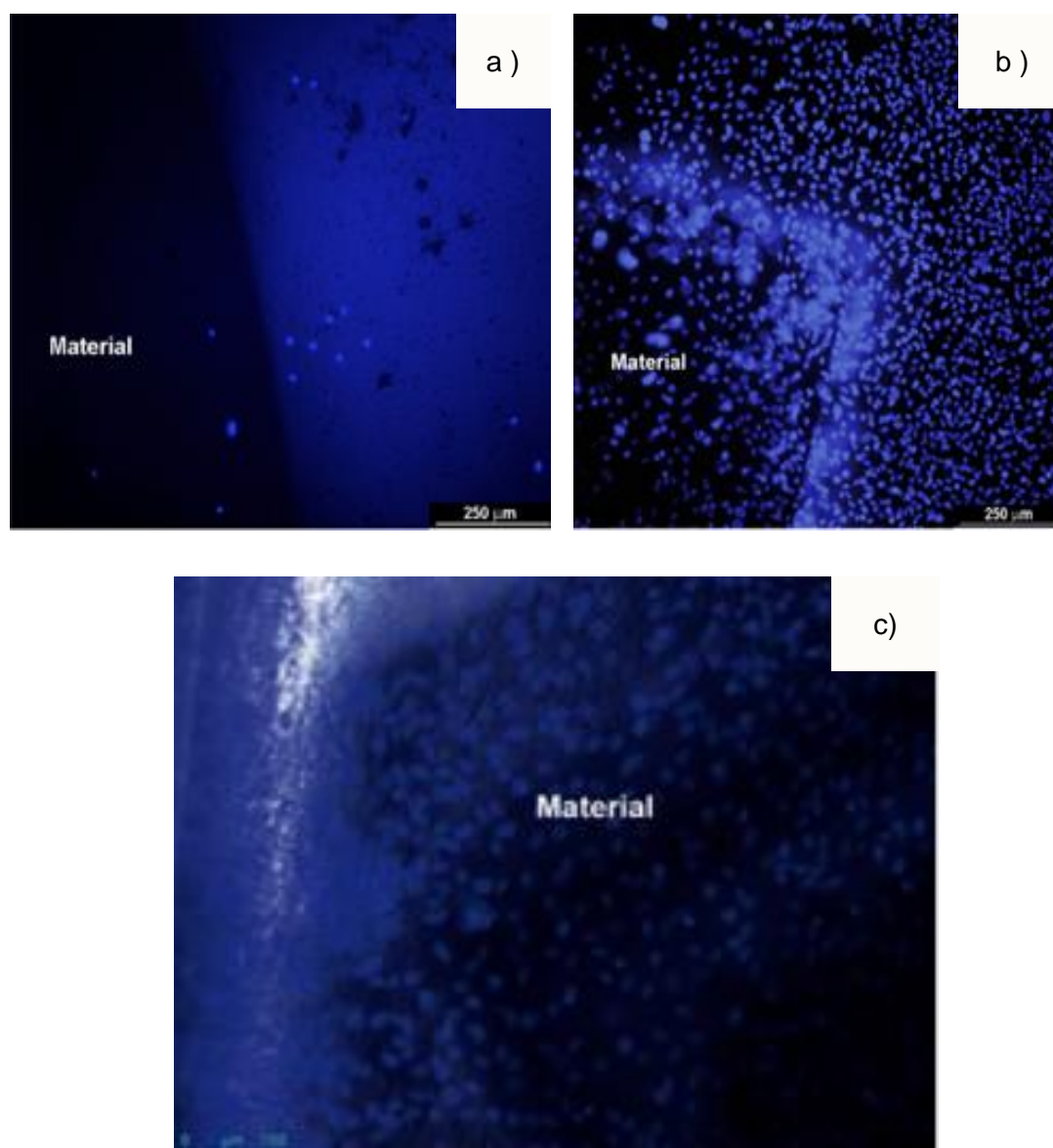


Figura 4.13-Células osteoblásticas MC3T3-E1 sobre el Mg PM(a), el Mg colado(b) y la aleación AZ31 (c) con recubrimiento de fluoruro de magnesio (detección por fluorescencia del reactivo de Hoechst 33258).

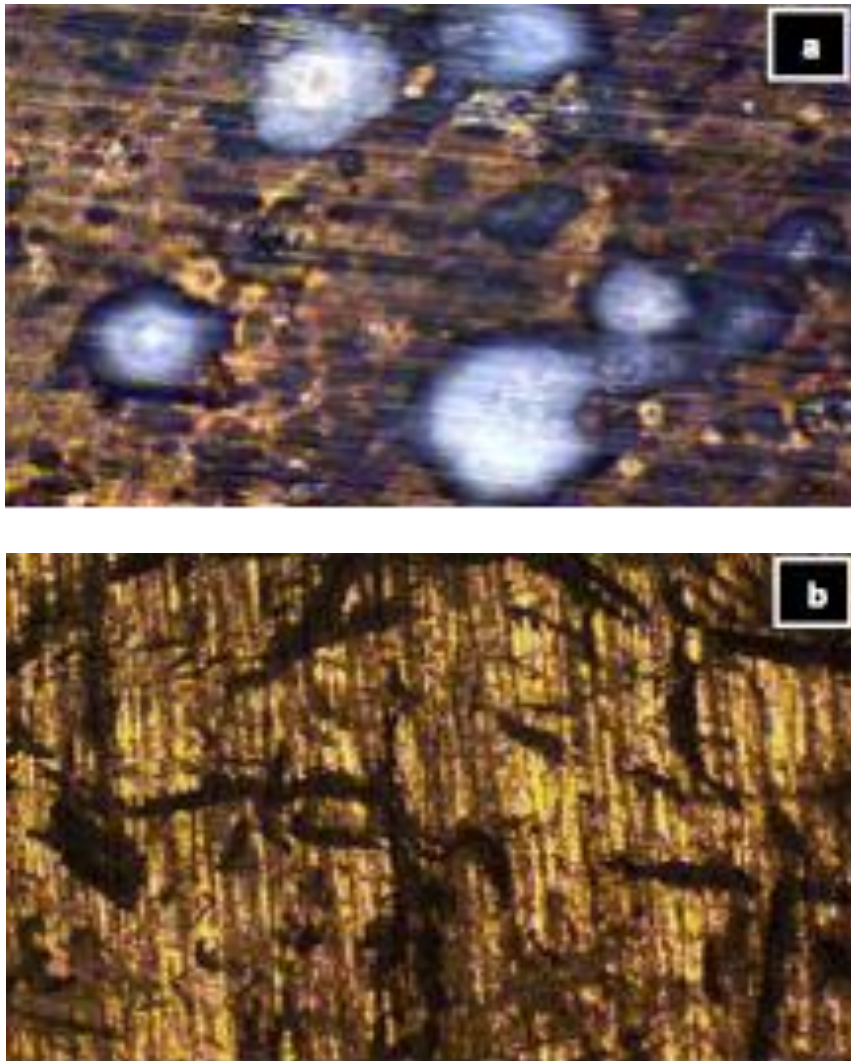


Figura 4.14.- Morfología del ataque por corrosión en Mg (colado) tras 11 días de inmersión en DMEM: a) muestra en estado de recepción y b) muestra con recubrimiento de fluoruro de magnesio (100×).

## **4.2 Resultados estudios *in vivo*.**

La literatura científica de materiales de base magnesio para su uso como potencial material endoprotésico de reparación muestra una falta de concordancia entre la experimentación *in vitro* e *in vivo* de dichos materiales. En el desarrollo de esta investigación se continuó con la investigación en experimentación animal con cirugías en calota de rata con el fin de contrastar y sopesar los resultados obtenidos *in vitro* tanto de corrosión como de biocompatibilidad con los obtenidos *in vivo*.

### **4.2.1.- Estudios de biocompatibilidad y biodegradación de los materiales de Mg en calota de ratas Wistar.**

Antes de insertar los distintos materiales de magnesio en ratas Wistar se evaluó el método de esterilización más idóneo. Analizamos dos métodos de esterilización convencionales para los implantes de uso en clínica, el vapor de agua y la radiación gamma. Las probetas esterilizadas en vapor de agua sufrieron una corrosión importante evidente; mientras que aquellas que fueron esterilizadas con rayos gamma no sufrieron alteraciones visibles ni observables mediante microscopía óptica (figura 4.15).

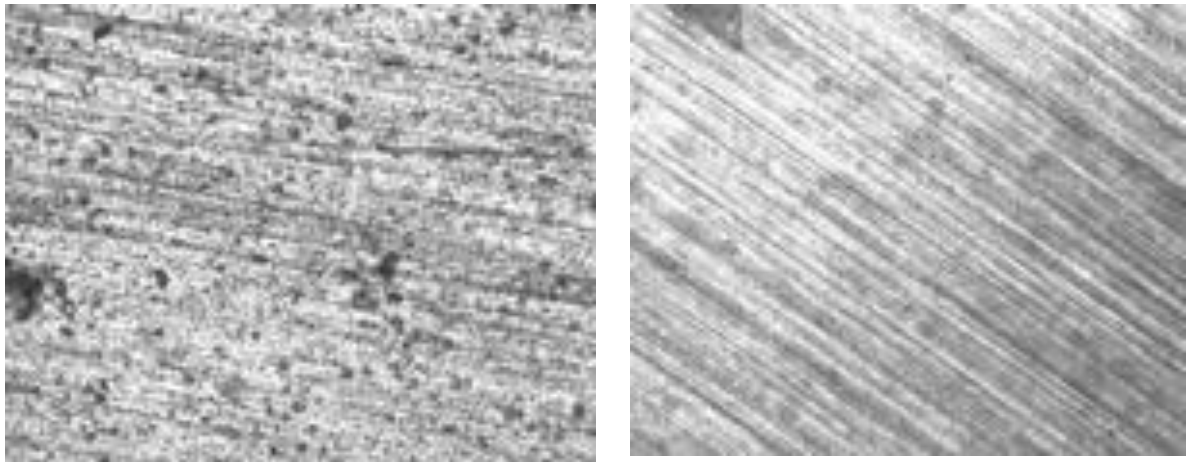


Figura 4.15.- Imágenes de la superficie de AZ31 esterilizadas mediante vapor de agua (izquierda) y radiación-  $\gamma$  (derecha).

En el desarrollo de esta investigación el material de osteosíntesis se introdujo en posición subgaleal en los animales de experimentación. En esta posición es posible observar la reacción de corrosión de manera indirecta a través del seguimiento de la reacción catódica de la ecuación y, por tanto, de la producción de gas que se situará en posición subcutánea y por la elasticidad de los tejidos será fácilmente observable.

Uno de los animales se extrajo el material en el postoperatorio inmediato, el resto permaneció insertado durante todo el estudio, sin extrusiones ni exposiciones de las probetas. No sufrieron ningún tipo de intolerancia local ni complicaciones inflamatorias o infecciosas. Tampoco ningún animal sufrió alteraciones en su comportamiento.



Figura 4.16. Vista lateral y anterior de las ratas con la bolsa de gas subcutáneo

Durante los primeros 7 días no se produjo ninguna reacción local. La Figura 4.16 muestra imágenes de la cabeza de los animales con evidencia del proceso de corrosión que tiene lugar en el material implantado en contacto con los fluidos fisiológicos, observándose considerables abultamientos debidos a la producción de gas como consecuencia de la reacción catódica de corrosión. La formación de estas bolsas de gas aparece aproximadamente a los 15 días en las ratas que portaban aleación AZ31 en estado de recepción y a los 30 días en las ratas con implantes de la AZ31 recubiertos con fluorhídrico.

Los estudios de biocompatibilidad y los estudios de degradación precisan del estudio macro y microscópico de las probetas de base Mg biodegradadas y del material orgánico que las envuelve. Una vez sacrificados los animales, se les extraen las muestras del material parcialmente degradado para su estudio en el departamento de corrosión y los tejidos circundantes se embuten en parafina y se tiñen para los estudios histológicos. En la imagen de la figura 4.17 observamos una pieza extraída a los 7 días.

En todos los casos existía una cápsula fibrosa que rodeaba completamente el material. Se extraen todas las piezas con dicha cápsula.



Figura 4.17, imagen de la pieza extraída a los 7 días

La Figura 4.18 muestra la secuencia de degradación del material insertado en el animal de experimentación a lo largo del tiempo. Según se observa, el material implantado sufre una reacción de encapsulamiento mediante tejido fibroso transcurrida una semana aproximadamente de su inserción (b de figura 4.18). La observación macroscópica no revela alteraciones importantes en su superficie. Los bordes y aristas no muestran alteraciones. A los 15 días el material ha comenzado a degradarse en bordes y aristas por ser zonas activas de corrosión (c de figura 4.14).

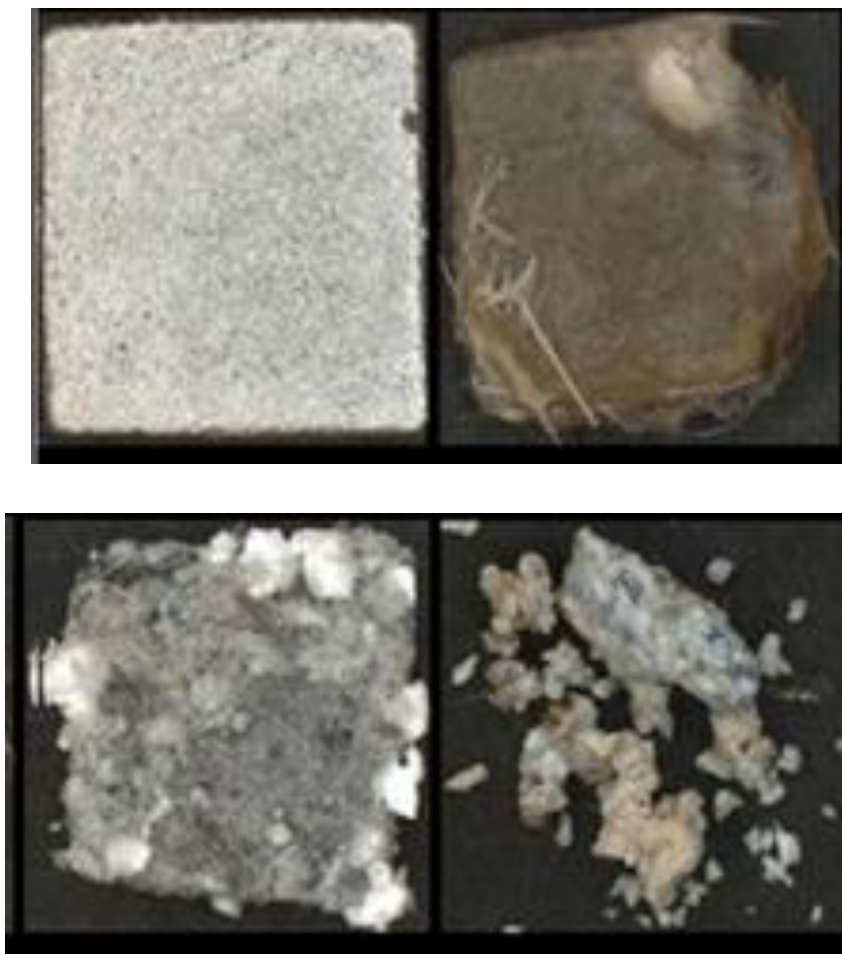


Figura 4.18.- Degradación de la aleación AZ31 con recubrimiento de fluoruro de magnesio para diferentes tiempos de permanencia en el animal experimental: a) antes de insertarla, b) 7 días, c) 15 días y d) 48 días.

Esta reacción electroquímica genera productos de corrosión blanquecinos (óxidos e hidróxidos de magnesio) que son los productos blanquecinos que se encuentran apuestos sobre la superficie del implante, ya observado en los cultivos celulares y en DMEN. En los implantes extraídos a los 48 días (d de figura 4.18) se observa cómo se ha producido una degradación importante hasta casi su desaparición.



El porcentaje del material reabsorbido es para los materiales de Mg puro PM y colado a los 24 días es entorno al 21%, mientras que en el caso de la AZ31 es del 8% (Tabla 4.2). Sin embargo, a los 48 días, el porcentaje de material reabsorbido es el mismo para todos los materiales estudiados (alrededor del 61%).

En cuanto a los materiales recubiertos con la capa de  $MgF_2$ , todos sufren una reabsorción del 100% a los 48 días.

MATERIAL	Tiempo (días)	Masa inicial (g)	Masa tratamiento (g)	Masa final estudio	Incremento de masa	% material reabsorbido
<b>Mg PM</b>	24	0,0484	-	0,0391	0,0093	20
	48	0,0945	-	0,0342	0,0602	63,81
<b>Mg colado</b>	24	0,0457	-	0,0357	0,0100	21,88
	48	0,471	-	0,0179	0,0292	61,99
<b>AZ31</b>	24	0,0489	-	0,0448	0,0041	8,38
	48	0,0480	-	0,0195	0,0285	59,36
<b>Mg Pm + capa</b>	24	0,0480	0,476	0,0409	0,0067	14,07
	48	0,0488	0,0485	0,0000	0,0485	100
<b>Mg colado + capa</b>	24	0,0941	0,0561	0,0226	0,0335	29,17
	48	0,0471	0,0469	0,0000	0,0469	100
<b>AZ31 + capa</b>	24	0,0473	0,0470	0,0410	0,0060	12,67
	48	0,0474	0,0472	0,0000	0,0472	100

Tabla 4.2 resumen de las medidas de los pesos medios por grupos y su % de reabsorción calculado

Los resultados histológicos nos demuestran que una vez insertada la probeta se produce una reacción de encapsulamiento que comienza en la primera semana que engloba al material por completo. Esta capa de tejido conectivo es bastante constante entre los distintos animales y para los distintos tiempos. No existen diferencias



significativas en el grosor o en la morfología de dicha capa entre las de las muestras recubiertas frente a las insertadas sin modificación superficial para todos los materiales ensayados. El tejido neoformado está compuesto por fibroblastos y una cantidad constante de sustancia intercelular. Existe una ausencia de macrófagos u otras células inflamatorias o de reacción a cuerpo extraño. La anchura media de esta capa es de 0,17 mm (0,125- 0,215 mm) ( figura 4.19).

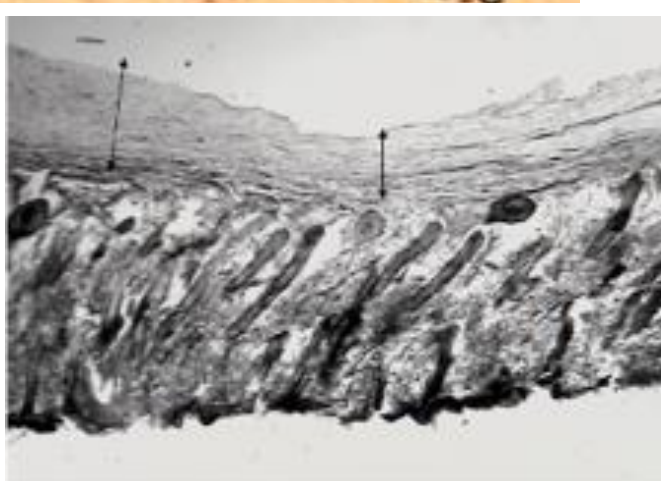
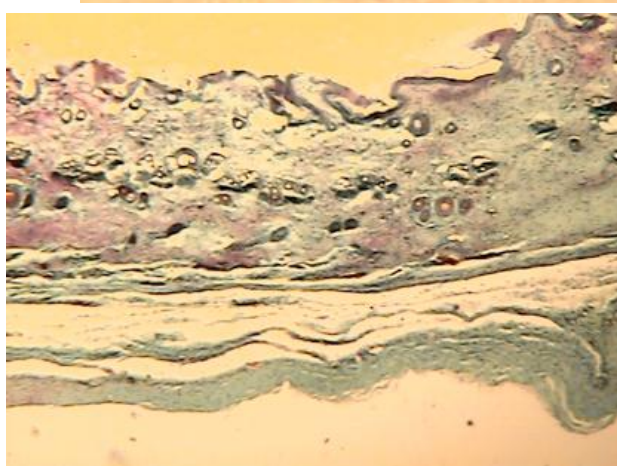
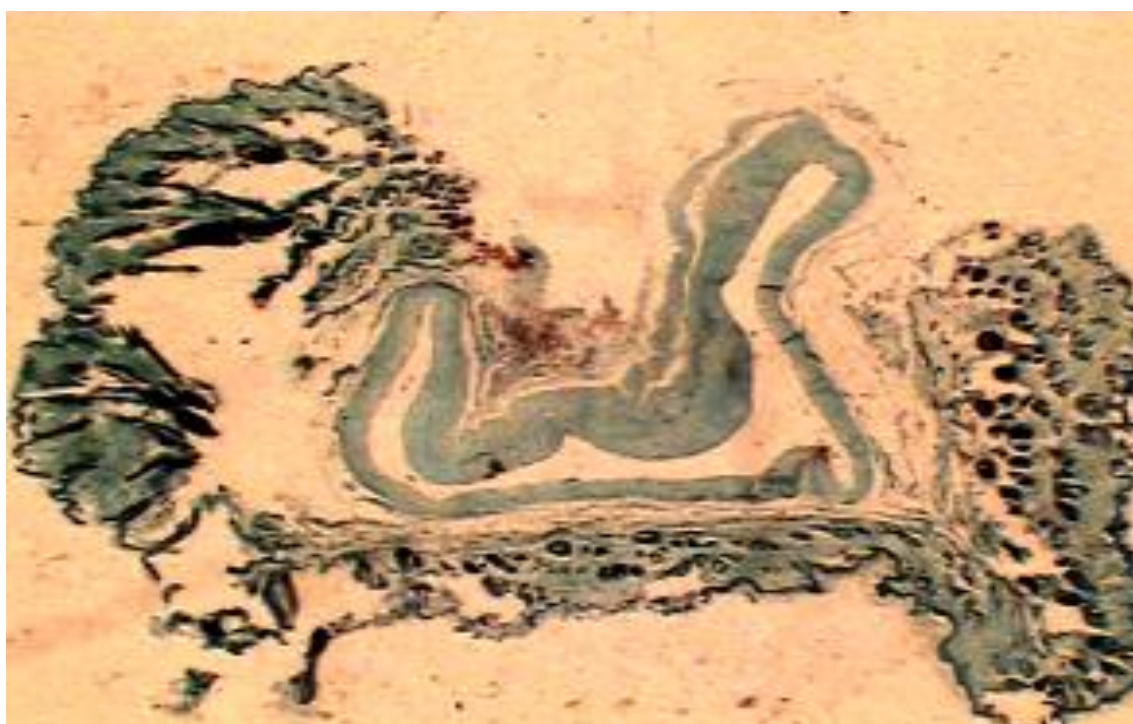


Figura 4.19. Resultados histológicos. A) cápsula fibrosa que rodea al material. b) Capa de tejido conectivo sin células de cuerpo extraño ni inflamatorias. C) espesor de la capa de fibrosis de 0,105 mm

#### 4.2.2.- Estudio de la biocompatibilidad y de la degradación del material de base Mg en fémures de rata.

El estudio sistemático en experimentación animal se llevó a cabo en los fémures de ratas. El cronograma experimental y los grupos se especificaron en material y métodos. A partir de este momento la experimentación in vivo continuó con la AZ31.

El seguimiento del hueso con y sin fractura, el clavo y la reacción de corrosión se realizó mediante técnicas radiológicas. Precisamos de una prueba de imagen lo suficientemente sensible como para poder distinguir bien los contornos del material y que además sea adecuada para el seguimiento de la enfermedad de la fractura.

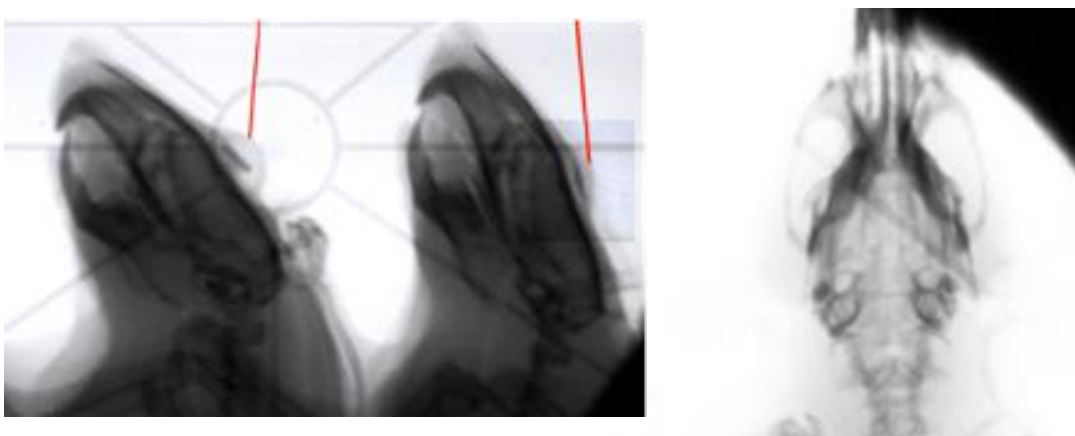


Figura 4. 20.- Radiografía convencional de la calota de la rata a)imagen lateral, en la que se visualiza el material sólo si existe una interfase de aire entre éste y el hueso, b)imagen anteroposterior en la que es imposible distinguir el material.

El número atómico del Mg es muy parecido al del Ca, y por tanto la radiopacidad es similar en la radiología convencional.

Por ello las imágenes radiológicas convencionales no resultaron suficientemente discriminativas y sólo en el momento en el que el material se alejaba de la superficie ósea era posible distinguir entre el material y el contorno óseo (Figura 4.20). Las probetas sólo pueden visualizarse en las radiografías convencionales, en las que el material se engloba en una bolsa de gas y que se despegan del hueso.

El siguiente paso fue buscar el método de seguimiento más adecuado. Se realizaron pruebas con resonancia magnética (RM) y con tomografía computerizada (TC). Para ello diseñamos un clavo endomedular de AZ31 sin ninguna modificación de superficie que se insertó en el canal medular de los fémures. Se realizaron las dos pruebas de imagen en ese animal. (Figura 4.21). Si bien la RM nos permite evaluar la disposición de los productos de corrosión, es el TC la prueba de imagen que mejor se corresponde para el estudio del fémur, el material insertado y la producción de gas.



Figura 4.21.- Derecha, imagen de tomografía computadorizada. Izquierda, imagen de resonancia magnética

Los estudios de biocompatibilidad se realizaron en todos los animales sacrificados en el estudio. La histología de los fémures con y sin fractura revelaron los mismos hallazgos. El tejido óseo está bien conservado. La cortical externa presenta características normales con el periostio conservado y sin actividad de remodelación anormal. La cortical interna presenta zonas de reabsorción y en algunos puntos el estímulo del endostio ha producido neoformación ósea y en otros escasa reabsorción. No aparecen osteoclastos y sí osteoblastos. (Figura 4.22)

Al mes, el implante se encuentra rodeado de una fina capa de tejido conectivo fibroso que se dirige hacia el material desde el endostio, y que con los estudios de luz polarizada puede corresponder a tejido óseo en formación muy indiferenciado (Figura 4.22).

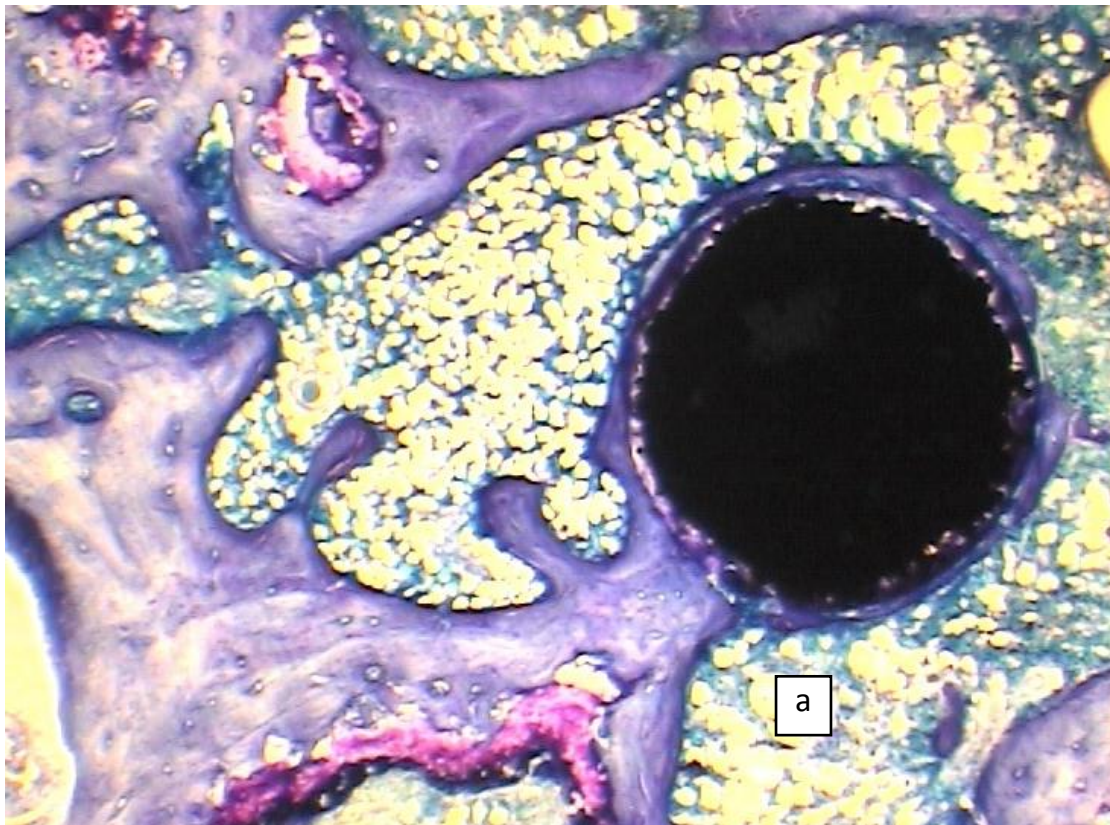


Figura 4.22 – Imagen a 5 aumentos del material intramedular alojado en la cavidad intramedular al mes.



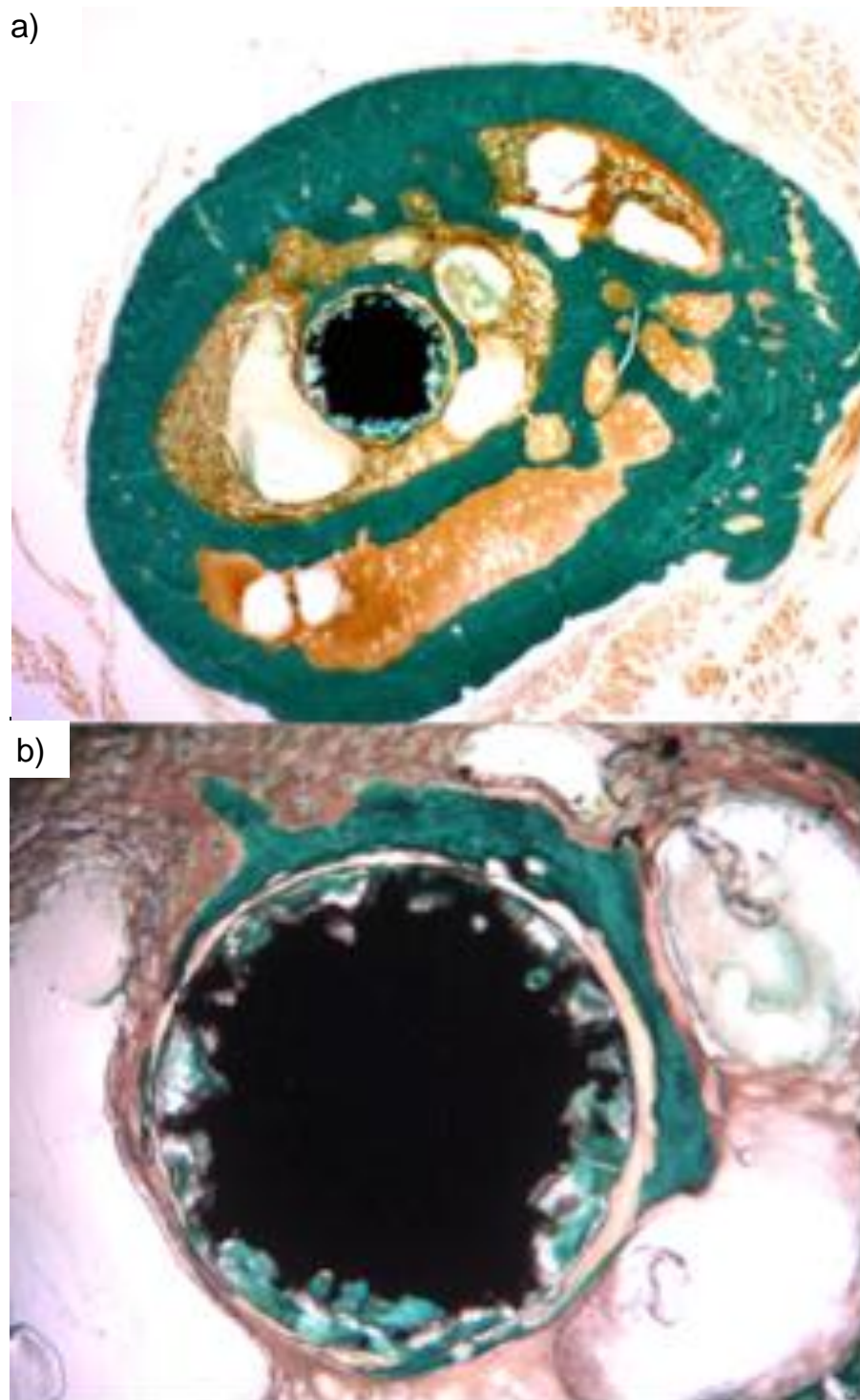


Figura 4.23.- Imagen a 4 meses del materia a) 5 aumentos, b) 10 aumentos

Al cuarto mes ese tejido es más maduro y rodea parcialmente al material (figura 4.23)

En la figura 4.24 observamos el material alojado en la cavidad intramedular del fémur de la rata. Se trata de imágenes anatomopatológicas a 9 meses de la inserción del material.

El clavo está alojado en el centro de la cavidad intramedular rodeado de la médula ósea que es tejido graso circundante rodeando al material (marcado como a) en la fig. 4.22.

A mayor aumento (5X) podemos observar cómo las trabéculas de tejido óseo maduro rodean al material (marcado como a en la figura 4.24)

En imágenes a mayor aumento (10X), podemos diferenciar osteocitos (letra a) de la figura 4.24). El material no se encuentra rodeado por ninguna capa de tejido fibroso, sino rodeado de tejido óseo maduro y presenta una corrosión por picaduras en su superficie.

El espacio entre el hueso nativo y el implante está relleno de un material que se corresponde con los productos de corrosión (letra b) y en ese espacio hay también hueso neoformado.

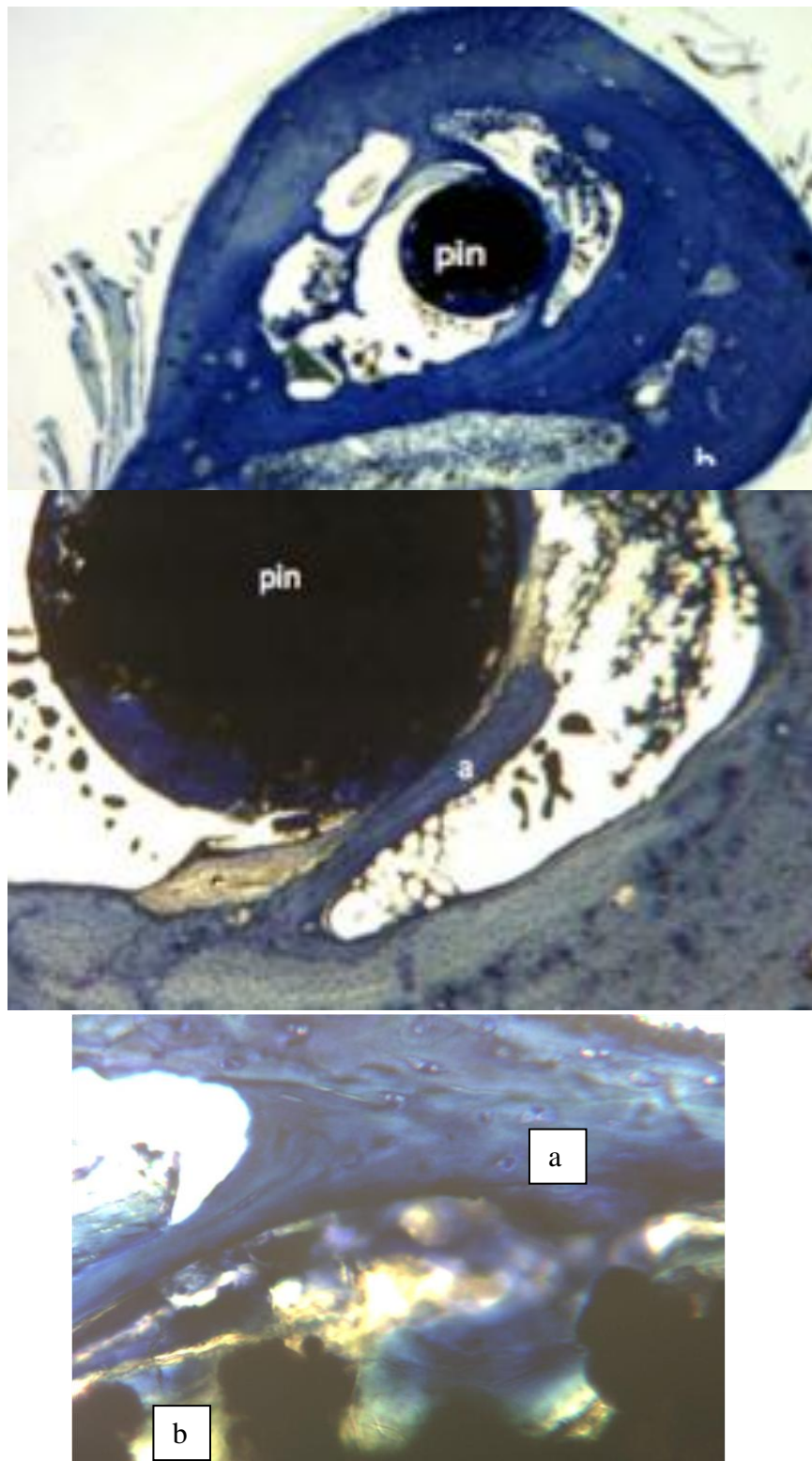


Figura 4.24.- Imágenes histológicas a 9 meses. a) 1,6 aumentos, b) 5 aumentos, c) 10 aumentos.

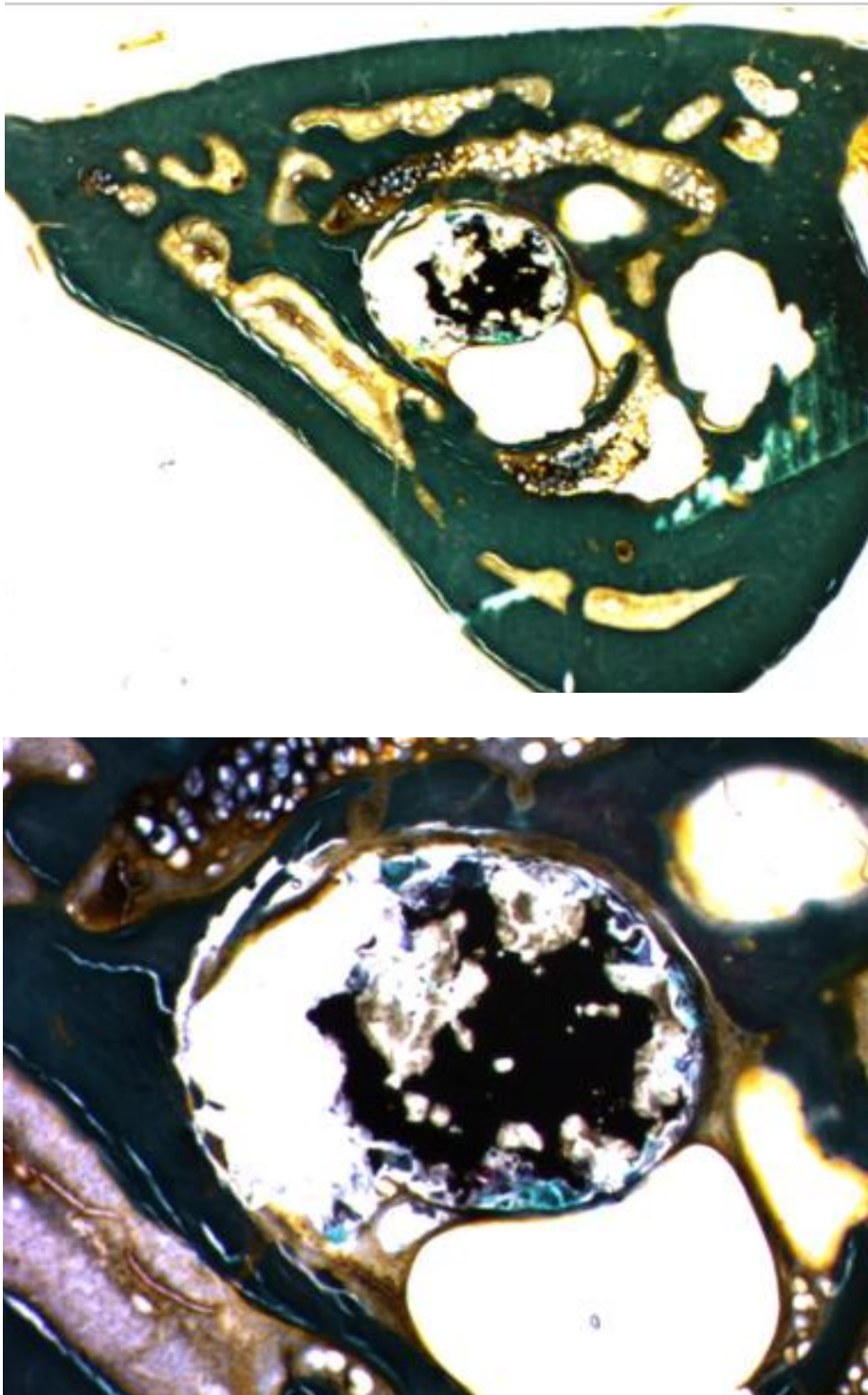


Figura 4.25- Estudio histológico de secciones transversales de fémures a 13 meses. Superior 1,6 aumentos, inferior 5 aumentos.



En las imágenes de los cortes longitudinales (Figura 4.26) de los fémures de las ratas se evidencia la integridad de la parte central del implante, viéndose sólo la corrosión en la periferia del mismo.

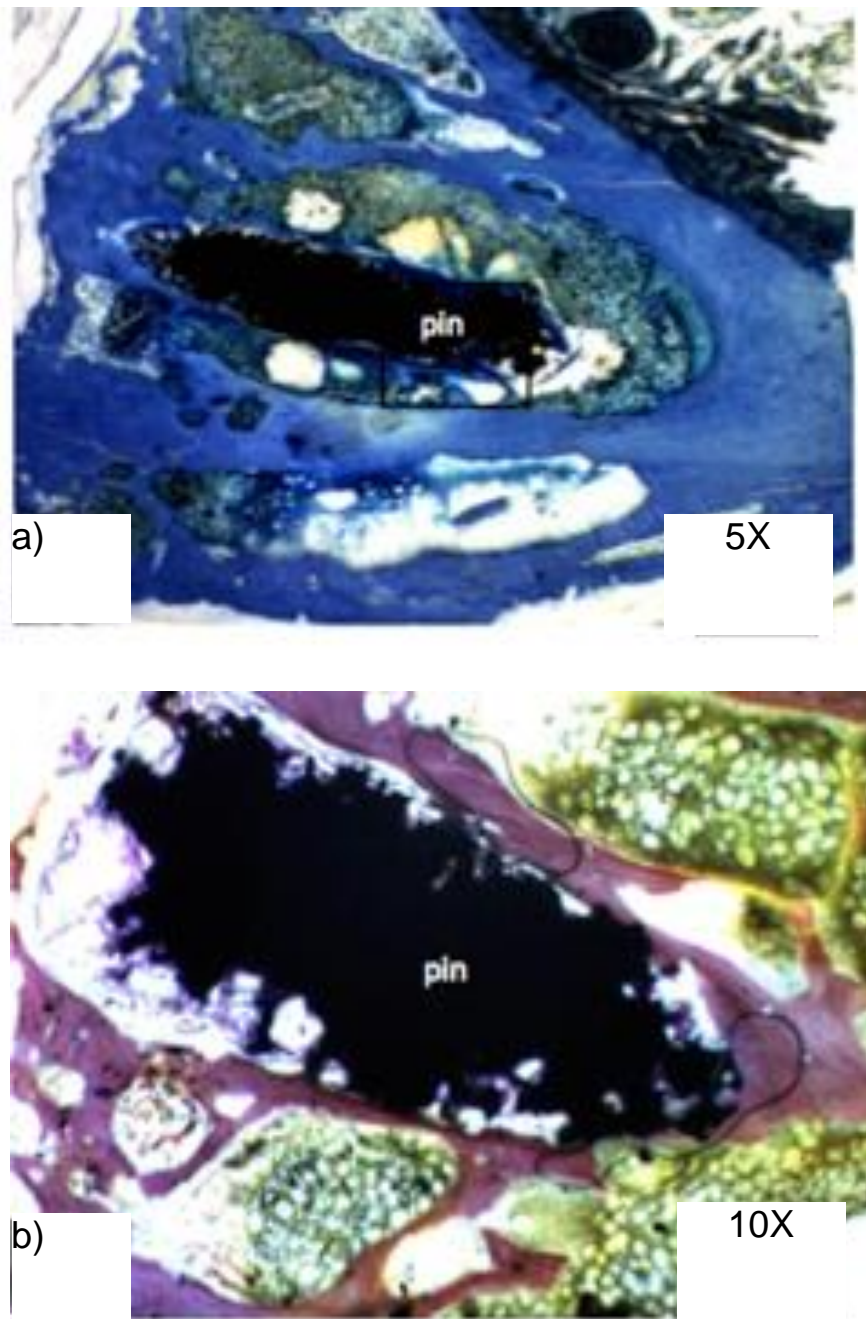


Figura 4.26.- Evolución de la degradación del material AZ31 insertado intramedularmente en los fémures de rata al mes 9, secciones longitudinales. a) imagen a 5 X. b) a 10 X

Por tanto, el material no presenta ninguna cápsula fibrosa que lo englobe y separe del hueso, ni reacción a cuerpo extraño ni reacción inflamatoria. Además el material presenta una corrosión que comienza en superficie y va avanzando paulatinamente hacia el centro del material. A 9 meses comprobamos que esa biodegradación no ha afectado al centro del implante.

En el mes 13, el neohueso se encuentra firmemente adherido a la superficie del implante(figura 4.25). La degradación es mucho mayor y el centro de la probeta ya muestra picaduras de corrosión.

Comprobada la biocompatibilidad del material procedemos al análisis de la corrosión *in vivo*.

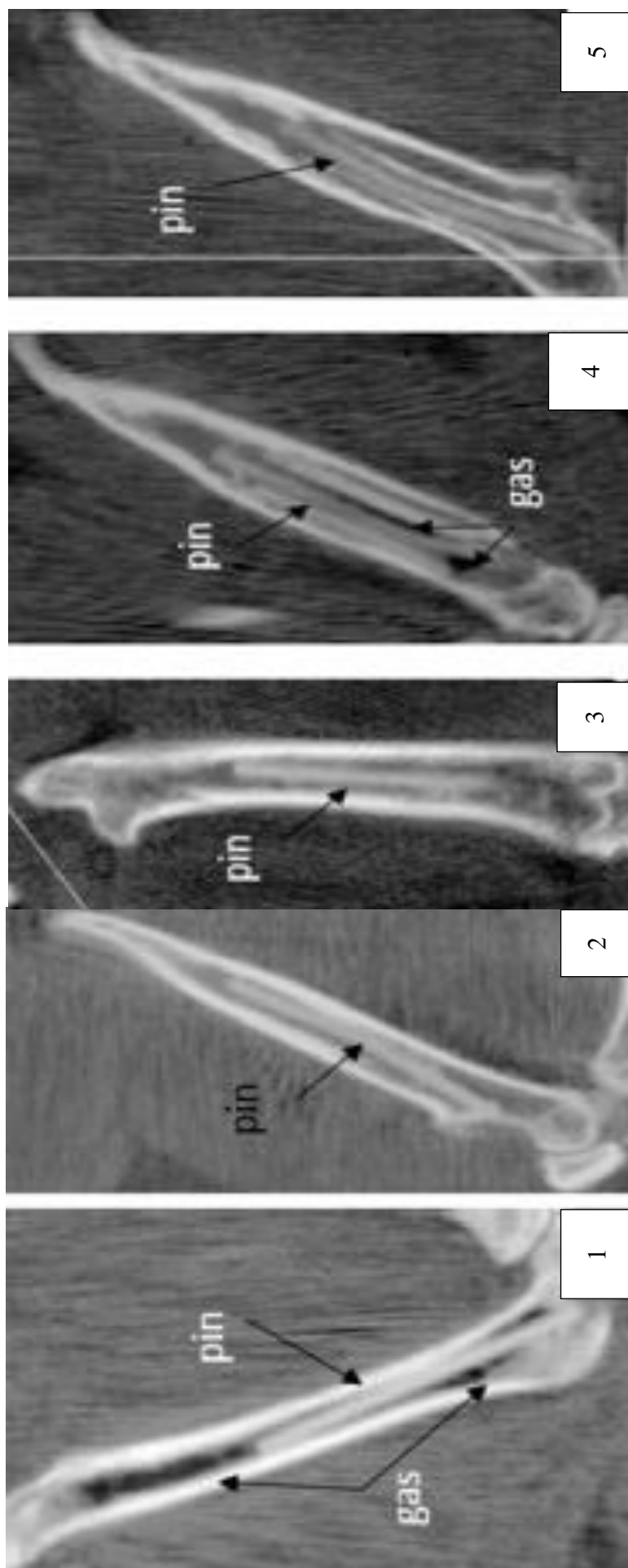


Figura 4.27.- Imágenes de TC en ratas sin fractura a 1, 3, 5, 10 y 13 meses, respectivamente

La figura 4.27 muestra la evolución radiológica mediante TC con el tiempo en los animales sin fractura. En ellas se puede observar la evolución del hueso, el clavo y el gas desde el mes a los 13 meses.

Si observamos la varilla, comprobaremos que esta tiene unos contornos delimitados en las imágenes a 1 mes, persistiendo o manteniéndose dicho contorno hasta los 3 y 5 meses. Posteriormente estos contornos van perdiendo nitidez convirtiéndose en difíciles de delimitar.

	Fémures no fracturados
Tiempo (meses)	Volúmen de gas (mm <sup>3</sup> ) media ± desviación estándar
1	12,11 ± 6,43
3	6,45 ± 3,91
4	1,32 ± 0,68
8	1,29 ± 1,24
9	1,07 ± 1,20
10	0,96 ± 1,21
12	0,23 ± 0,42
13	0

Tabla 4.3.- Volumen de gas en las ratas sin fractura

En cuanto a la formación de gas observamos que el gas aparece en gran cantidad al mes y su distribución es mayoritariamente metafisaria (imagen 1). Este gas es apenas perceptible al 5 mes (imagen 3) y reaparece en el 10 mes (imagen 4), para posteriormente desaparecer por completo. Esta secuencia se repite tanto para los materiales recubiertos como para los desnudos.

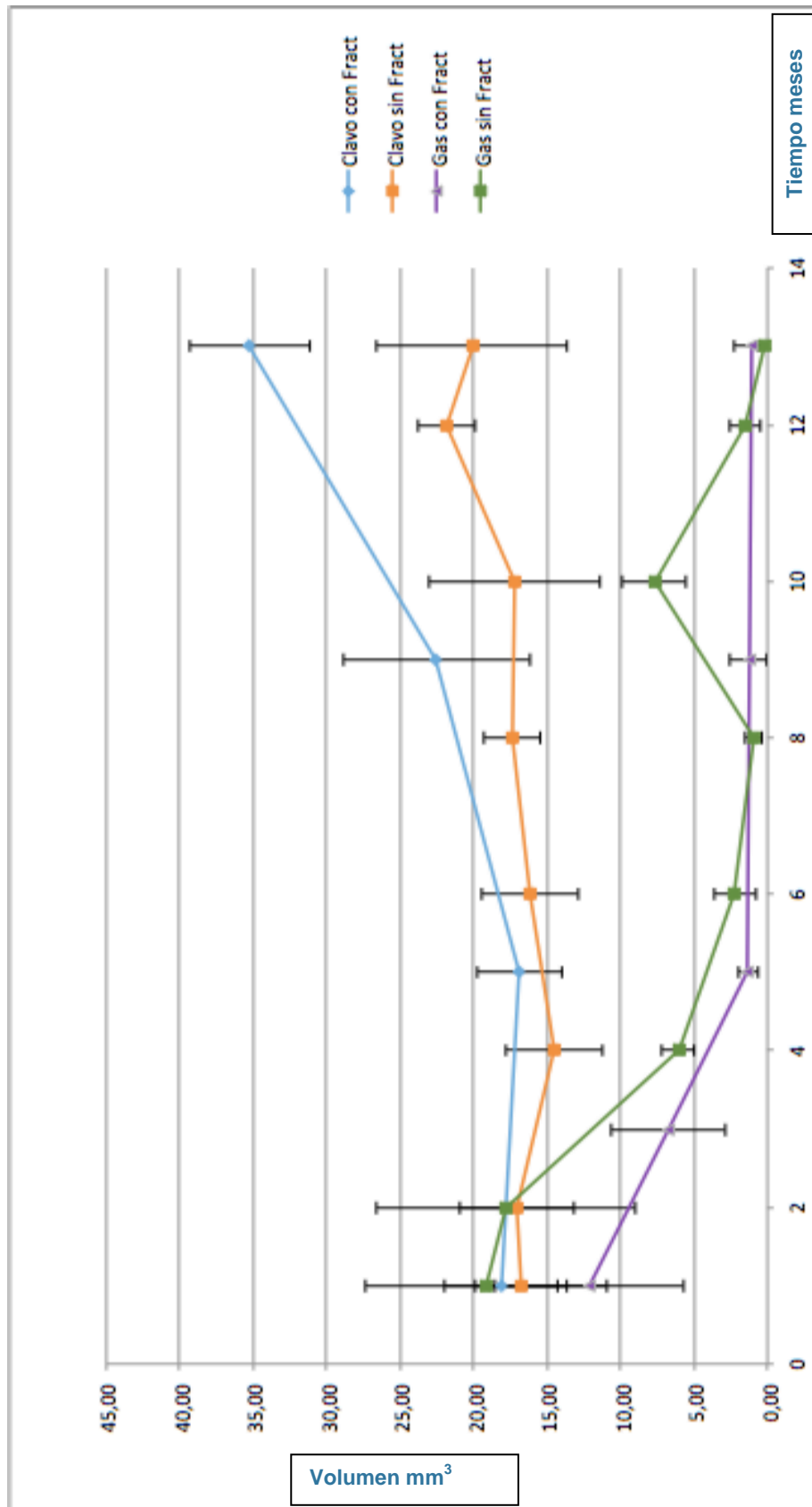


Figura 4.28.- Cuantificación de los volúmenes de gas y del clavo con el tiempo

Mediante el programa de TKSnap, se cuantificaron los volúmenes de la varilla, el gas y el tamaño del fémur. La figura 4.28 muestra cuantitativamente la evolución del volumen tanto del clavo como del gas. El volumen del clavo aumenta porque es difícil distinguir el contorno entre la superficie del implante y sus productos de biocorrosión.

Se procedió, por tanto, a valorar y cuantificar la aparición de gas (tabla 4.3), dado que según la ecuación el volumen de gas liberado es equivalente a la cantidad de AZ31 biodegradada. Como se puede observar en la figura 4.23 y en la tabla 4.3, la formación de gas sigue una pauta general que es un aumento muy importante en el primer y segundo mes, para disminuir posteriormente. El gas acumulado al mes tiene una media de  $19,098 \pm 8.21 \text{ mm}^3$  (tabla 4.3). Es de reseñar que entre el 8 y el 10 mes existe un aumento en la cantidad de gas producida en este grupo de animales (figura 4.24). Esta curva de gas tiende a disminuir y se llega a  $1,561 \pm 1,07 \text{ mm}^3$  a los 13 meses. Existe una diferencia estadísticamente significativa entre el volumen de gas al mes y a los 13 meses con  $p < 0,05$ . No siendo esta diferencia significativa entre el resto de los meses en estudio.

Para conocer si los datos obtenidos con la cuantificación de gas, se corresponden con los datos reales, se realizó la histomorfometría de las ratas a 1, 9 y 13 meses. Se midió la pérdida de volumen según se explicó en el apartado de material y métodos. Los resultados se muestran en la tabla 4.4.

<b>Fémur sin fractura</b>	<b>Tiempo ( meses)</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>Material sin recubrimiento</b>	1	21,98	3,38
	9	41,25	5,4
	13	56,27	13,84

Tabla 4.4. Resultados de histomorfometría de las ratas sin fractura %reabsorción material



Figura 4.29.- Evolución de la fractura, el clavo y el gas en fémures de ratas en relación al tiempo 1, 3, 5, 10 y 13 meses mediante la técnica de TC



En la figura 4.29 se observa la evolución de la fractura de fémur, el clavo intramedular y el gas en el grupo de ratas con fractura.

Observamos cómo es la evolución de la fractura: el callo de fractura aparece en el 2º mes en todos los casos, se trata de un callo de fractura hipertrófico. Los animales no pudieron inmovilizarse, por lo que una vez pasadas las primeras horas tras la cirugía, se encontraban caminando sin problemas. El material consiguió mantener la alineación entre los fragmentos, pero con una estabilidad relativa. A 5 meses el 100% de los animales presentan la consolidación ósea (3 de fig 4.29), con un callo de morfología normal. La capacidad de remodelación de la rata condiciona que en las imágenes a 7 y 10 meses, la morfología del fémur recuerda más al hueso normal.

La varilla intramedular pierde sus contornos bien definidos desde el 3 mes, desdibujándose en el interior de la cavidad medular.

El gas comienza apareciendo en las imágenes al mes en las metáfisis femorales y en el foco de fractura, que es donde aparentemente se encuentra en mayor cantidad. Las burbujas de gas se distribuyen alrededor del foco de fractura. Ocupan el foco de fractura y las partes blandas de alrededor sin llegar a formar bullas lo suficientemente grandes como para ponerse en contacto con la piel.

Las mediciones de los volúmenes tanto del clavo como del gas se observan en la figura 4. 28. Desde el segundo mes el tamaño del clavo es aparentemente mayor que para las ratas sin fractura.

La cuantificación del gas (tabla 4.5) nos muestra una gran producción de gas en el primer mes que disminuye siguiendo casi una pauta lineal entre el mes 1 y el 5, para posteriormente tener una disminución mucho más lenta. Existe una diferencia significativa en la producción de gas entre el mes 1 y 3 con respecto al resto de los tiempos con  $p < 0,05$ .

	<b>Fémures fracturados</b>
<b>Tiempo (meses)</b>	Volúmen gas (mm <sup>3</sup> ) media $\pm$ desviación estándar
<b>1</b>	19,09 $\pm$ 8,21
<b>3</b>	17,77 $\pm$ 8,80
<b>4</b>	6,02 $\pm$ 1,07
<b>8</b>	4,31 $\pm$ 4,59
<b>9</b>	3,18 $\pm$ 4,26
<b>10</b>	4,92 $\pm$ 1,90
<b>12</b>	1,56 $\pm$ 1,07
<b>13</b>	0,21 $\pm$ 0,20

p para 1/13= 0,031

Tabla 4.5 Evolución de la cantidad de gas en las ratas con fractura en relación con el tiempo

Si desglosamos los datos en aquellos animales a los que se les introdujo AZ31 recubierta y a los que se les introdujo AZ31 sin recubrir observamos que la curva de producción de gas es casi paralela, aunque existen unas pequeñas diferencias. Los primeros meses no hay diferencias en la producción de gas, pero a partir del quinto mes esas diferencias existen, siendo mayor la cantidad de gas que se produce en las patas de los animales que tienen varillas recubiertas. Estas diferencias no son significativas estadísticamente.

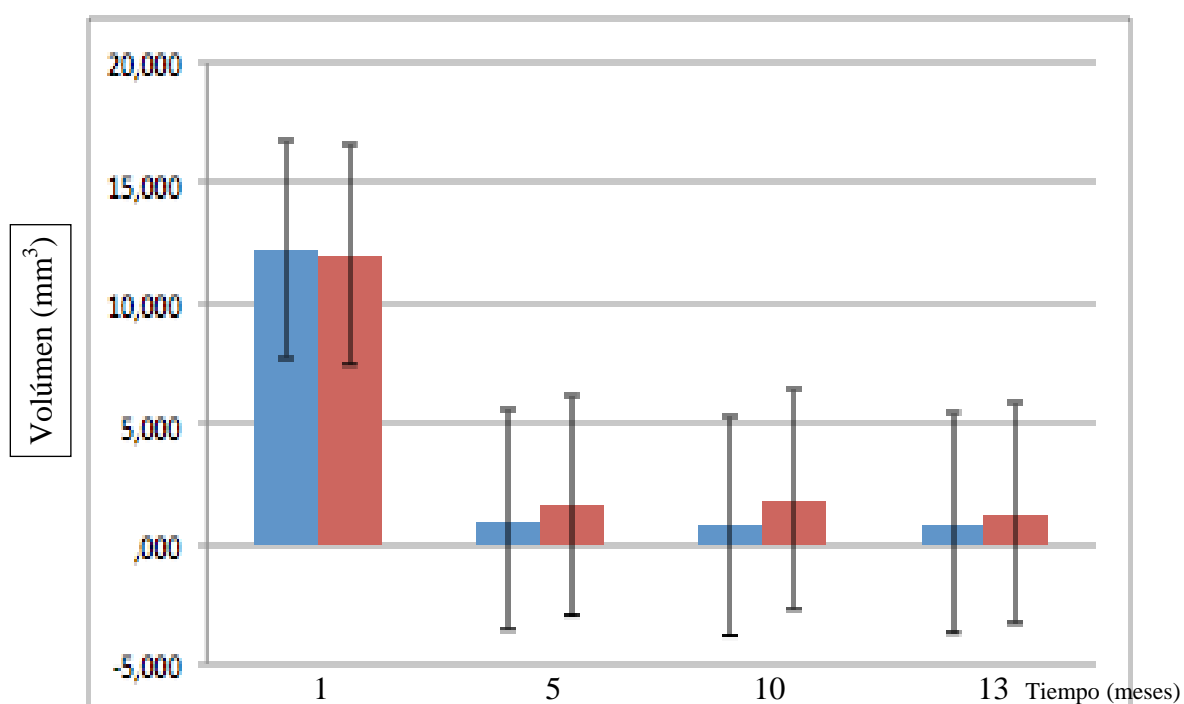


Figura 4.30 Diferencia en la evolución de la pérdida de masa entre los materiales recubiertos y no recubiertos en las ratas con fractura de fémur. Azul sin  $\text{MgF}_2$ , Rojo con  $\text{MgF}_2$

Los datos de la histomorfometría de las ratas con fractura se muestran en la tabla 4.6

Fémur con fractura	Tiempo ( meses)	Media	Desviación estándar
Pin sin recubrimiento	1	26,34	1,89
	13	53,51	16,82
Pin con recubrimiento	1	24,52	5,00
	13	30,20	4,42

p para sin/con recubrimiento a 1 mes= 0,812

p para sin/con recubrimiento a 13 meses = 0,014\*

Tabla 4.6 Resultados del análisis histomorfométrico en las ratas con fractura. % Reabsorción de material.

En el caso de los fémures con fractura, se analizó además la influencia de la capa de  $\text{MgF}_2$  en la pérdida de volumen del material. La diferencia de pérdida de volumen entre el material recubierto y el desnudo en el mes 1 no es significativa con una  $p=0,812$ . Sin embargo, sí existen diferencias significativas en la pérdida de volumen entre los materiales recubiertos y los no recubiertos con una  $p= 0,014^*$ .

### 4.3.- Validación en un modelo matemático

Lo principal de este apartado es identificar variables que afectan la biodegradación de implantes de base magnesio a través de modelos matemáticos en experimentación *in vivo*.

Las variables consideradas han sido el espesor del electrolito que baña la superficie de los implantes de magnesio y la densidad de partículas embebidas en los implantes de Mg.

#### 4.3.1 Procedimiento teórico

La biodegradación *in vivo* de implantes de base magnesio, considerando la variación de potencial en el electrolito fisiológico, ha sido matemáticamente simulada de imágenes TC de implantes de AZ31 en fémures de rata.

El primer dominio usado en la aproximación teórica de la situación física real *in vivo* se muestra en la Figura 4.26.

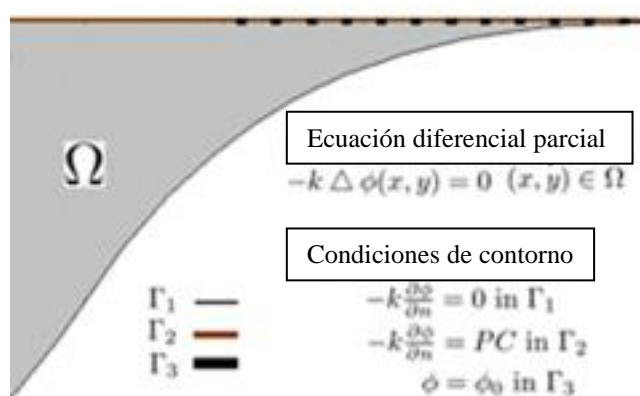


Figura 4.31.- Esquema bidimensional de la situación física de cambio en el espesor de electrolito considerando la ecuación de Laplace

En esta figura, una variación continua en espesor  $h$ , es considerada simulando el diferente espesor de electrolito que baña la superficie de magnesio.

$\Omega$  representa el electrolito usado;  $\Gamma_1$ , es un aislante eléctrico;  $\Gamma_2$  es el implante de base magnesio por el que fluye la corriente dada por su correspondiente Curva de Polarización (PC);  $\Gamma_3$ , representa los precipitados, defectos o partículas incluidas en el implante de base magnesio;  $D$  es el diámetro de las partículas y  $M$  es la distancia entre ellas. El electrolito esta contenido entre dos bordes: un aislante eléctrico y otro que representa el material base de magnesio.

#### **4.3.2 Ensayos in vivo**

La figura 4.32 muestra imágenes de fémures (sin y con fractura) de ratas con implantes de AZ31 en la cavidad medular después de 1 y 3 meses de su implantación.

En los fémures no fracturados (Figure 4.32.a), se puede observar que el espesor de electrolito en contacto con el implante de AZ31 está limitado por el hueso cortical.

Según se muestra en las imágenes de la figura 4.32 es evidente que la reducción en el espesor del electrolito depende de la anchura de la cavidad medular así como del diámetro del implante. Así el espesor del electrolito podría ser incluso cero en algunas situaciones específicas. Considerando que el ingreso de fluido es a través de la epífisis un distinto espesor de electrolito que baña el implante hará que en principio teóricamente se promuevan diferentes cinéticas de corrosión a lo largo del implante de AZ31. Los resultados muestran que el implante metálico se biodegradará menos agresivamente en el centro, donde el espesor del electrolito es menor que en los extremos donde este espesor es considerablemente mayor. En el caso de fractura diafisaria (Figura 4.32 b), la superficie del implante está en contacto con músculo y

presenta una mayor irrigación que los implantes que están insertados en fémures no fracturados.

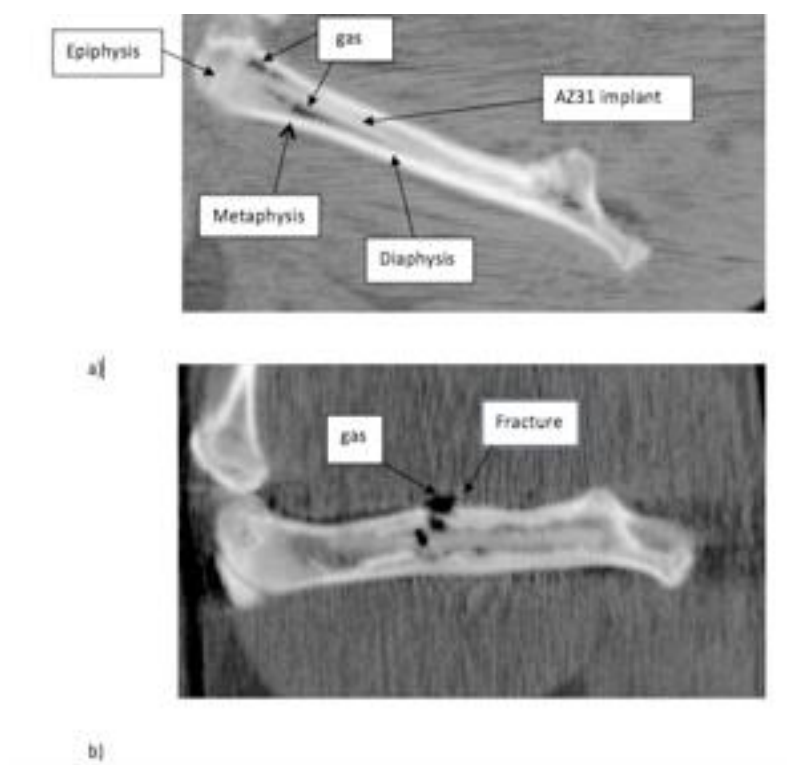


Fig. 4.32.- Vista sagital de CT de fémures de rata con implantes de magnesio a) sin fractura a los tres meses de su implantación y b) con fractura al mes de su implantación. Las áreas negras es el gas producido como consecuencia de la biodegradación del magnesio

Teniendo en cuenta que la corrosión *in vivo* de los implantes de magnesio está gobernada por la ecuación. Durante el primer mes el gas alrededor del implante, se focaliza en la región de la metafisis y en el área de fractura. A los tres meses el gas decrece en ambos casos. El contorno del material implantado a los 5 meses se desvanece, aunque el material persiste después de los 13 meses (figura 4.29).

### 4.3.3. Simulación matemática

Para simular la degradación *in vivo* a través del modelo de la figura 4.28, datos de las curvas anódicas de polarización experimentales de las superficies de base magnesio son incluidos en el modelo matemático como función lineal en el borde  $\Gamma_2$ .

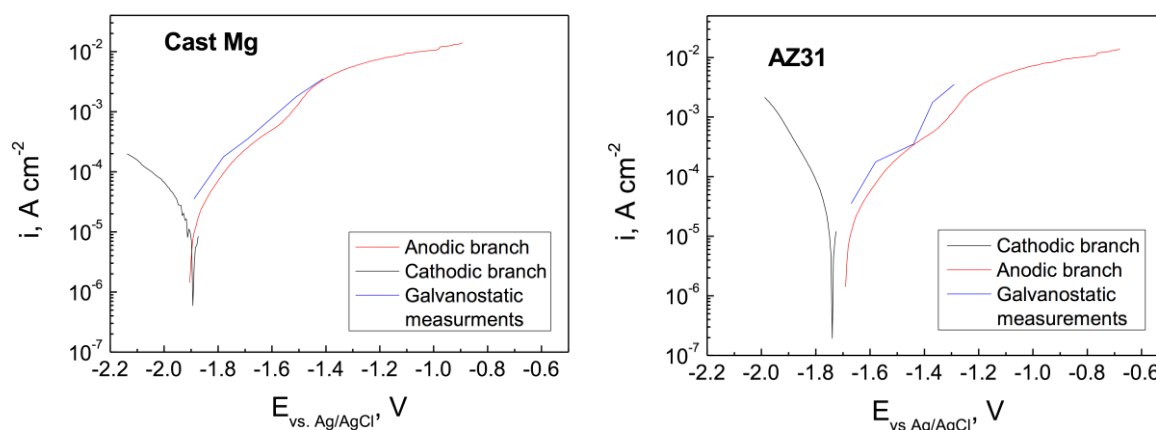


Fig. 4.33.- Curvas de polarización potenciodinámica. a) del magnesio colado y b) de la AZ31 inmersas en PBS.

La figura 4.33 muestra las curvas de polarización obtenidas para la aleación AZ31 y el Mg colado en PBS. La densidad de corriente de corrosión,  $i_{corr}$ , en el potencial de corrosión y el brazo anódico revela que ambos materiales están activos y un moderado incremento en corriente se produce a medida que la polarización aumenta.

Un requerimiento de los datos de polarización, para ser validos en el modelo matemático es que sean una función lineal en los bordes  $\Gamma_2$  (figura 4.26) y que el sistema debe alcanzar el estado estacionario. Las curvas de polarización han sido obtenidas en un estado muy cercano al estado estacionario y pueden ser usadas en el modelo matemático.



#### 4.4.-Evaluación toxicológica y sistémica de los elementos metálicos biodegradados.

Se procedió a comparar el nivel de trazas metálicas en ratas control y ratas portadoras de implante al mayor tiempo de ensayo, 13 meses. Los resultados obtenidos se ofrecen en la Tabla 4.7.

	Sin implante		Con implante		ANOVA
	Media	Desv. Std.	Media	Desv. Std.	p
<b>Mg</b>	563,60	111,72	641,08	115,32	0,242
<b>Al</b>	0,81	0,75	4,64	2,98	0,024*
<b>Mn</b>	2,13	1,98	2,62	2,00	0,682
<b>Zn</b>	64,41	11,28	65,37	10,38	0,808

Datos en ppm (peso seco).

\* =Diferencias significativas al 95%

Tabla 4.7 Contenido en elementos metálicos en ratas con y sin implante, sacrificadas 13 meses después de la cirugía. ANOVAs para las comparaciones entre pares con/sin implante para cada elemento.

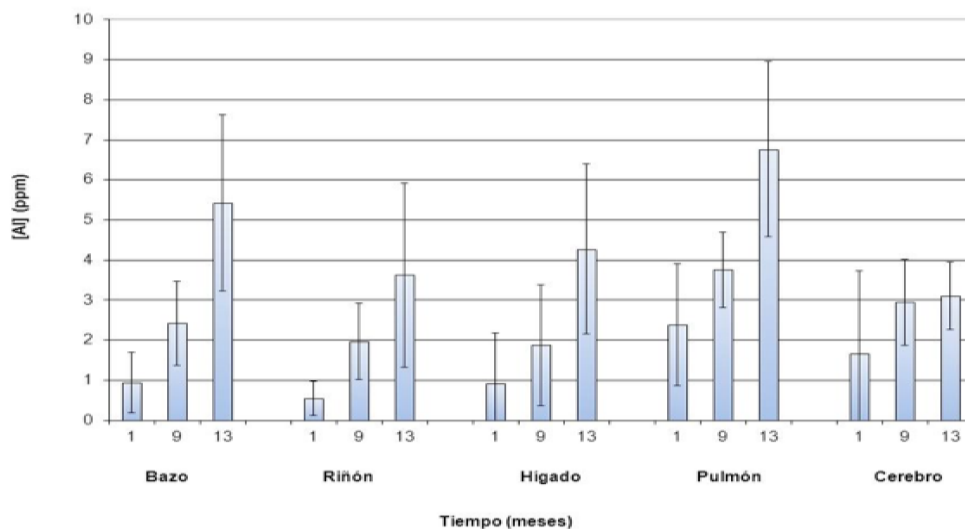
Se puede apreciar como todos los elementos analizados en los distintos órganos (sumatorio de todos los órganos) presentan un mayor nivel en las ratas portadoras de implantes AZ31 con respecto a las ratas control, lo que demuestra que los productos de biodegradación de la AZ31 pueden difundir por el organismo hasta alcanzar diversos órganos.

También se puede apreciar en la tabla 4.7 que de todos los elementos analizados Mg, Al, Zn, Mn sólo el Al presenta una diferencia estadísticamente significativa.

Teniendo en cuenta los posibles problemas de toxicidad relacionados con el Al y dado que presenta un incremento estadísticamente significativo, se realizó un estudio exhaustivo de la acumulación del Al separándolo por órganos para todos los tiempos de estudio considerados, 1, 9 y 13 meses. Como puede apreciarse en la figura 4.29, el contenido en Al aumenta con el tiempo en todos los órganos estudiados.

Figura 4.29 Contenido en Al en órganos de ratas sacrificadas tras diferentes tiempos de implantación. Datos en ppm. Las barras de error representan la S.D.

Llevado a cabo un análisis estadístico se pudo comprobar que este aumento se veía confirmado, a la vista de los resultados reflejados en la Tabla 4.8 en todos los



órganos a excepción del cerebro donde no se encontraron diferencias significativas (ANOVA > 0,05) tras 13 meses desde la inserción del implante.

	ANOVA
<b>Bazo</b>	0,002*
<b>Riñón</b>	0,031*
<b>Hígado</b>	0,008*
<b>Pulmón</b>	0,014*
<b>Cerebro</b>	0,086

\* =Diferencias significativas al 95%

Tabla 4.8 Valores de ANOVA para contenido de Al correspondientes a las comparaciones entre 1 y 13 meses para diferentes órganos.

La influencia del factor tiempo en la acumulación de trazas metálicas no sólo del Al sino de todos los elementos analizados queda resumida en la Tabla 4.9. Los datos muestran un incremento con el tiempo en los contenidos de Mg y Mn el ya detectado de Al, mientras que los correspondientes al Zn se mantienen estables a partir del noveno mes.

	1 mes		9 meses		13 meses	
	Media Std.	Desv.	Media Std.	Desv.	Media Std.	Desv.
<b>Mg</b>	570,03	86,36	622,04	153,65	641,08	115,32
<b>Al</b>	1,32 <sup>a,b</sup>	1,41	2,60 <sup>a,b</sup>	1,24	4,64 <sup>b,c</sup>	2,98
<b>Mn</b>	2,22	1,63	2,34	1,91	2,62	2,00
<b>Zn</b>	63,50	13,78	65,60	14,59	65,37	10,38

Datos en ppm.

a,b,c=Diferencias significativas al 95%

Tabla 4.9 Contenido de metales en órganos de ratas sacrificadas a diversos tiempos de implantación.







El empleo de materiales reabsorbibles para la osteosíntesis de fracturas evita los problemas de la corrosión de los mismos por el organismo y polémica sobre la retirada o no de los mismos (73). En la actualidad los materiales poliméricos son los únicos utilizados en la práctica clínica.

En este contexto, buscamos un material con características mecánicas parecidas a las del hueso y que se degrade una vez consolidada y remodelada la fractura. El magnesio es un material metálico que aúna ambas características, si bien presenta dos problemas fundamentales, su rápida corrosión y por tanto, la rápida pérdida de sus propiedades físicas y mecánicas.

### ***1.-Evaluación in vitro de los materiales de base Mg.***

En una primera fase se realizaron los estudios *in vitro* para la selección del material más adecuado para la osteosíntesis de las fracturas. El Mg en estado puro posee un modulo elástico muy parecido al del hueso (3-20 GPa el del hueso y 41-45 GPa el del Mg), pero en base a su elevada reactividad electroquímica puede perder propiedades mecánicas que son necesarias para las aplicaciones en huesos sometidos a carga mecánica. Por ello se intentó mejorar las propiedades físicas del magnesio puro mediante diferentes vías: la elección del método de procesado más idóneo, (45,68,72,74,75) o bien alearlo con otros elementos metálicos dado que con pequeñas

cantidades de otros elementos, se puede mejorar las propiedades mecánicas (51,76,77).

Para la elección del material de base magnesio más adecuado se tuvieron en cuenta dos características fundamentales. Por un lado que tuvieran la suficiente resistencia mecánica como para ser capaz de estabilizar una fractura, y por otro que la velocidad de biocorrosión fuera lo suficientemente lenta como para poder dar tiempo a la consolidación ósea.

De los tres materiales ensayados: Mg colado, Mg pulvimetalúrgico y la aleación AZ31, se decide seleccionar la aleación AZ31 como adecuada tanto por sus características físicas, como por su disponibilidad en la industria, pues es una aleación de uso comercial (78,79). Se trata de un material con tamaño medio de grano de 25,7 micras, su límite elástico es de 150MPa con una tensión máxima de 300 MPa que supera los requerimientos mecánicos del hueso natural (figura 4.3 b). Si comparamos con los otros materiales ensayados la resistencia mecánica de la AZ31 es comparable a la de las muestras de Mg procesado por vía pulvimetalúrgica Mg(PM) y es muy superior a la de las muestras de Mg obtenido por colada (figura 4.3 a)

Respecto al segundo requisito de que el material de base Mg presentase mayor resistencia a la corrosión, se pudo observar cómo de los materiales en estado de recepción el que presentaba una mayor resistencia en medio de cultivo celular, DMEM era la aleación AZ31, seguida por el Mg colado y el Mg PM (figura 4.6)(43,64,80).



Los procesos de recubrimiento de los materiales les dotan de una mayor resistencia a la corrosión. Son muchos los recubrimientos descritos en la literatura. En este estudio se analizó el recubrimiento con fluoruro de magnesio. Se trataron mediante conversión química en medio de ácido fluorhídrico los materiales previamente estudiados, obteniéndose un recubrimiento cerámico de fluoruro de Mg (figura 4.3) (55,69)

Este tratamiento no debe modificar las propiedades mecánicas del material base, debe modular la biocorrosión, y además debe demostrar adecuada biocompatibilidad. (81,82) La capa que en nuestro estudio se obtiene es uniforme y está firmemente adherida a todos los sustratos de Mg (figura 4.3).

El comportamiento comparativo de los materiales de base magnesio sin recubrir y recubiertos mostró que la reactividad electroquímica de la superficie de los materiales en estudio mediante la sonda Kelvin, se reduce significativamente debido a un ennoblecimiento del potencial en superficie, indicando una menor reactividad superficial en los materiales recubiertos (figuras 4.5 y 4.6). Por tanto, la capa de fluoruro de magnesio tiene un efecto protector frente a la corrosión. Estos resultados confirman los estudios previos realizados por otros autores (83,84). Si se mide cuantitativamente esta reducción de actividad mediante la resistencia de transferencia ( $R_t$ ) (a mayor  $R_t$  mayor resistencia a la corrosión y, menor velocidad de corrosión), nos encontramos que en los diagramas de Nyquist de la aleación AZ31, se puede observar que el diámetro del semicírculo ( $R_t$ ) disminuye con el tiempo de inmersión en el medio de cultivo celular, indicando la pérdida progresiva de resistencia a la corrosión del

material con el tiempo (figura 4.7). Sin embargo, cuando la aleación se encuentra recubierta la resistencia aumenta significativamente. Esto se observa en la figura 4.8 donde la amplitud de los arcos obtenidos aumenta con respecto a los registrados para el material en estado de recepción. De hecho, para tiempos cortos de inmersión (1 día) la aleación muestra un comportamiento altamente capacitivo, caracterizado por una respuesta en impedancia prácticamente paralela al eje imaginario del diagrama de Nyquist que se asocia al efecto protector del recubrimiento generado. Al aumentar el tiempo de inmersión (7 días) el arco capacitivo tiende a abatirse sobre el eje real, encontrándose claramente definido a los 11 días de experimentación. Para este tiempo, el material recubierto (figura 4.8) muestra un comportamiento frente a la corrosión muy similar al mostrado por la aleación en estado de recepción transcurrido 1 día de ensayo (figura 4.7), con valores de  $R_t$  del orden de  $3-5 \times 10^4 \Omega \text{cm}^2$ . Con este estudio comparativo se demuestra que los mejores resultados de resistencia a la corrosión se han alcanzado cuando la aleación AZ31 es tratada con HF, dado que genera una capa de  $\text{F}_2\text{Mg}$  menos reactiva, con potenciales más nobles (900 mV) (figura 4.6) que las superficies de AZ31 sin tratar (300 mV). Esta capa es compacta y adherente y, en ensayos *in vitro*, es capaz de aislar durante un mayor tiempo al Mg de los fluidos fisiológicos, frenando la cinética del proceso de corrosión.

Una vez comprobadas las características mecánicas de los materiales y su disminución en la velocidad de corrosión, que los acerca a las necesidades concretas del estudio, se necesitaba conocer su biocompatibilidad.

Se comenzó analizando la biocompatibilidad en cultivos celulares (85). Para ello se realizaron ensayos en presencia de células SAOS-2 y osteoblastos MC3T3-E1. Los resultados mostraron que la aleación AZ31 con recubrimiento de fluoruro de magnesio tiene una buena biocompatibilidad con las líneas osteoblásticas ensayadas, de tal forma que la presencia de la capa protectora de fluoruro de magnesio sobre la aleación hace que la resistencia a la corrosión en el medio celular esté suficientemente controlada como para permitir el crecimiento celular en cultivos de osteoblastos, que es el contexto en el que se encuentra el material en el proceso de consolidación ósea (84,86,87).

El recubrimiento de fluoruro de magnesio obtenido mediante tratamiento de conversión química en ácido fluorhídrico frena significativamente la cinética de degradación de los materiales de base magnesio en medio fisiológico, tanto en presencia de células osteoblásticas como en ausencia de ellas (88,89).

La tabla 5.1 resume las características de los materiales estudiados *in vitro*, Tanto en estado de recepción como los recubiertos (90).

	Resistencia mecánica	Resistencia a la corrosión	Viabilidad celular
<b>Mg PM</b>	Muy alta	Muy baja*/ baja**	x
<b>Mg colado</b>	Baja	Baja*/ alta**	si**
<b>AZ31</b>	Alta	Baja*/ alta**	si**

Tabla 5.1.- Resumen de las propiedades de los materiales estudiados

De dicha tabla, se pueden extraer las siguientes conclusiones de los ensayos *in vitro*:

- El Mg PM presenta una elevada resistencia mecánica pero su insuficiente resistencia a la corrosión le hace inviable para su aplicación como biomaterial temporal.
- La aleación AZ31 muestra unas propiedades mecánicas adecuadas, además de un excelente comportamiento frente a la corrosión y viabilidad celular.
- El Mg colado no presenta suficiente resistencia mecánica, aunque presenta una excelente resistencia a la corrosión y buena biocompatibilidad, con la ventaja adicional de ser un material completamente reabsorbible, sin posible toxicidad asociada a los elementos de aleación.

## ***2.-Evaluación in vivo de los materiales de base Mg.***

El desarrollo de la investigación continuó evaluando la biocompatibilidad y la capacidad de biodegradación de los distintos materiales de base magnesio, en estado de recepción y recubiertos en ensayos en calota en animales experimentales, dada la gran controversia y las grandes diferencias encontradas en la literatura entre los resultados de estos materiales en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Antes de insertar el material en la calota del animal se evaluó el método más adecuado para su esterilización (50). Se decidió la esterilización mediante rayos- $\gamma$  debido a que fue el método que menor número de alteraciones produjo en los materiales ensayados, sobre todo en los materiales recubiertos, donde mediante vía húmeda las probetas a ensayar estaban ya atacadas, presentando un cierto grado de corrosión y ensuciamiento (figura 4.11). También en el diseño del material a ensayar se evitó las aristas vivas para evitar lugares preferentes de corrosión.

Los primeros estudios *in vivo* en calota de ratas nos permitieron valorar de manera indirecta la velocidad de la reacción pues las burbujas de gas formadas eran evidentes en el tejido celular subcutáneo del animal. Ninguno de los animales mostró ninguna alteración en el comportamiento, no tuvieron ninguna reacción inflamatoria ni infecciosa. Todo ello confirma la buena tolerancia de los tejidos *in vivo* al material. Mediante los estudios anatomopatológicos se pudo apreciar que no existían ni reacciones a cuerpo extraño ni reacciones inflamatorias que hicieran sospechar una intolerancia al mismo (figura 4.19) (84,91).

Se analizó la velocidad de corrosión mediante el análisis de la pérdida de masa de las probetas a distintos tiempos de sacrificio de los animales. Estos resultados de pérdida de masa, consecuencia de la reacción anódica, se corresponden con la aparición de burbujas de hidrógeno, reacción catódica de corrosión. La reacción de corrosión es por tanto más temprana en las probetas que no han sido modificadas superficialmente. Pero una vez comenzada la reacción, ésta es mucho más rápida en el

grupo que ha sido tratado en ácido fluorhídrico en el que en el 100% de los casos se llega en el día 48 a una reabsorción completa de las muestras de Mg.

Los análisis gravimétricos de las piezas extraídas confirman que la capa de  $\text{MgF}_2$  ralentiza la velocidad de corrosión del material, pero que una vez que ésta comienza es más rápida que en las probetas no recubiertas. Este proceso será objeto de discusión más adelante.

Con el fin de disminuir el número de animales para sacrificar y poder realizar un estudio del seguimiento de material y de la fractura, buscamos un método de radiodiagnóstico adecuado.

Las imágenes de la figura 4.16 muestran la calota con la probeta insertada en las primeras ratas ensayas. Se puede observar cómo se podía ver el material porque éste se encontraba subcutáneo y cuando se rodea de gas se separaba del hueso y era posible observarlo en las proyecciones laterales. No obstante el material de magnesio a evaluar posee un número atómico semejante al calcio y por tanto, era en muchos casos difícil distinguir el material del hueso (figura 4.20).

Por tanto, el seguimiento radiográfico convencional no fue posible cuando el material de base magnesio era insertado en la cavidad medular del fémur. Se procedió a valorar el proceso de biodegradación con el tiempo por distintos métodos por tomografía y resonancia.

De los distintos métodos radiológicos analizados (figura 4.21), decidimos realizar el seguimiento de los ensayos *in vivo* mediante TC (92). Este método de

diagnóstico por su alta resolución nos ha permitido valorar la biodegradación del material, el seguimiento de la consolidación ósea así como la posibilidad de cuantificar la reacción de biodegradación a través del gas producido en la reacción catódica sin necesidad de añadir animales extra para monitorizar estos procedimientos mediante el estudio anatomopatológico. Los estudios actuales de los distintos grupos de trabajo utilizan el TC como método estandar de seguimiento en los materiales de base magnésio. Si bien es un método caro y con el inconveniente de la alta radiación, es el único válido para el análisis morfológico del material.

En este momento del estudio tenemos un material seleccionado como el que mejor ajusta sus propiedades al objetivo del estudio. ¿Cuáles son esos requisitos?

- 1) Ser biocompatible (4,93).
- 2) Mantener sus propiedades mecánicas el tiempo suficiente hasta conseguir la consolidación ósea, por tanto, escasa degradación entre la 3 y la 16 semana, tiempo de formación del callo óseo (94,95),
- 3) Permitir una regeneración ósea ad integrum (se da entre los 12 y 15 meses), lo que quiere decir que durante todo este tiempo el material presente una degradación a velocidad controlada (96–100).

El resultado final es que exista un equilibrio adecuado entre el proceso de consolidación ósea y la biodegradación del material.

Pasamos a analizar el **requisito 1)** la biocompatibilidad.

Ni la clínica en el postoperatorio de estos animales, ni los estudios anatomopatológicos demostraron ninguna alteración ni reacción inflamatoria que haga incompatible el uso de este material (101–105). Es más, como consecuencia de la inserción de cualquier material en una cavidad intramedular existe un proceso de relativa osteolisis o reabsorción ósea que se considera normal. Con el material de base magnesio AZ31 no ha existido dicha osteolisis (figura 4.19), no aparecen osteoclastos y sí osteoblastos.

Todo ello confirma que se trata de un material con gran capacidad para su osteointegración en el hueso y propiedades osteoinductivas. Al 4º mes aparece una delgada capa fibrosa que rodea al material. Basándonos en los estudios de luz polarizada, esta capa corresponde a tejido óseo en formación (figura 4. 22, 4.23), que en los estudios a 13 meses confirman que el material está rodeado de una capa de tejido óseo maduro que rodea al material por completo (figura 4.24)(106–110).

Este neohueso se encuentra firmemente adherido a la superficie del implante. Ello es un índice directo de la buena biocompatibilidad del implante y la capacidad osteoinductiva del mismo, estos resultados están de acuerdo con lo obtenido por otros autores (12,69,111–114).

No existen diferencias histológicas en la reacción producida entre el material modificado superficialmente mediante  $F_2Mg$  y el no modificado (115).



### ¿Cómo se produce la corrosión de la AZ31 en el canal medular del fémur?

La reacción de corrosión in vivo sucede según dos semirreacciones:

-Anódica o de oxidación:  $\text{Mg}^0 + \text{H}_2\text{O de los fluidos corporales} \rightarrow \text{Mg}^{2+} + 2\text{e}^-$

-Catódica o de reducción:  $\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow + 2 \text{OH}^- + \text{H}_2 (\text{g})$

La primera semireacción comienza en la superficie del implante (con o sin modificación superficial) desde el primer momento de su inserción y sucede porque dicha superficie es bañada por fluido fisiológico con la presencia de agua y sales minerales, produciéndose así la formación de óxido e hidróxido de Mg juntamente con fosfatos y carbonatos que se depositan sobre la superficie metálica. Estos productos de corrosión y sales minerales han sido detectados y analizados previamente en ensayos *in vitro* (figura 4.10) y también en ensayos *in vivo* (36,51).

Estos compuestos, principalmente hidróxidos, forman una capa protectora. No obstante el fluido fisiológico es rico en iones cloruro y se da la circunstancia que cuando la concentración de iones cloruro alcanza una de concentración de 30 mmol/l (12) los hidróxidos de magnesio se transforman a cloruros de magnesio altamente solubles. Ello propicia la aparición de picaduras (figura 4.24) sobre la superficie del implante.

Cuando la concentración de cloruros en el fluido extracelular alcanza la concentración de 150mmol/l esta corrosión por picaduras es severa (12)En la figura 4.25 se identifica (marcado con la letra b) una zona blanquecina no orgánica que

corresponde a los productos de corrosión depositados. Estos óxidos e hidróxidos de Mg promueven la acumulación de fosfato cálcico y por tanto la formación de nuevo hueso alrededor del implante (b de la Figura 4.20) (116,117). Los óxidos e hidróxidos acumulados sobre la superficie del implante tienen un número atómico semejante al del Mg y esto hace que no se haya podido distinguir con claridad y precisión el contorno de la varilla de sus productos de corrosión en una imagen tomográfica convencional. Por ello se decidió cuantificar el proceso de biocorrosión midiendo la reacción catódica o de reducción, es decir la formación de gas. Este gas se queda acumulado alrededor del implante (figura 4.22 y 4.24). Dependiendo de la cantidad de gas que se produce, (20,36,116) y su velocidad de formación, el organismo es capaz de absorberlo e intercambiarlo por difusión o bien su exceso se acumula como burbujas alrededor del implante o del foco de fractura (figura 4.24). Los productos de corrosión procedentes del proceso de biodegradación (36) quedan apuestos sobre la superficie del clavo, protegiendo en cierta medida a la superficie del proceso de corrosión, sin embargo la irrigación y vascularización hacen que la probeta siga en un entorno dinámico y cambiante (8,118). Los productos de corrosión que crecen y se hacen más voluminosos y porosos el oxígeno y sobre todo el agua tiene buen acceso a la superficie metálica para seguir con el proceso de corrosión reactivándose la reacción electroquímica, por eso reaparece el gas en las metafisis, para posteriormente desaparecer (figura 4.28 y tabla 4.3).

La formación de gas sin embargo no es suficiente como para producir alteraciones estructurales en las corticales del fémur. No se produce ninguna fractura ni alteración en la morfología normal de fémur. Por ello suponemos que el organismo

132

es capaz de absorber el gas producido sin consecuencias estructurales. La probeta presenta unos contornos desdibujados aunque a 13 meses persiste bien estructurada dentro del canal medular (119).

Una vez que fuimos capaces de cuantificar el proceso de biodegradación in situ en el canal medular se continuó el estudio comprobando si la aleación AZ31 es válida para la osteosíntesis de las fracturas (120,121). Es decir, si la biodegradación del material se produce en tiempo y morfología como para mantener sus propiedades mecánicas el tiempo suficiente para conseguir la consolidación ósea (requisito 2). La pregunta planteada fue la siguiente:

**Requisito 2)** mantener las propiedades el tiempo suficiente para la consolidación ósea.

Los resultados han mostrado que la consolidación ósea se produjo en el 100% de los animales estudiados. El callo de fractura se visualizó al tercer mes y se consideró completamente consolidada la fractura al 5 mes, no existiendo ninguna pseudoartrosis (figura 4.24) (95,97,122).

Comparando ambos grupos (con y sin fractura), observamos que la producción de gas para ambos es mucho mayor en el primer mes y que posteriormente desciende hasta casi desaparecer. Sin embargo, el gas cuantificado en las ratas con fractura es menor que el de las ratas sin fractura. También en el grupo de ratas con fractura no existe esa oscilación de incremento y descenso que ocurría en la producción de gas en las ratas que no presentaban fractura (tabla 4.3). Todas estas diferencias pueden

atribuirse a que en la cuantificación de las imágenes tomográficas sólo aparece el gas intramedular y el gas peri-fractura, no habiéndose medido el gas difundido a través de las partes blandas con las que mantiene un íntimo contacto la AZ31 en la zona del foco de fractura; es decir, en presencia de fractura existe un entorno ricamente vascularizado, donde no se acumula el gas, sino que se intercambia, se disuelve y muy probablemente se elimina por los procedimientos biológicos habituales. Se puede pues asegurar que el gas se produce, pero no en la suficiente cantidad o a una velocidad muy elevada como para que no pueda difundir, no produciendo por tanto las acumulaciones de bolsas de gas, detectables por TC(114,118). Esta es la razón por lo que la formación de gas visualizado en los TC no se relaciona con los datos de reabsorción de la histología. En ellos la reabsorción al mes no muestra diferencia significativas ( $p < 0,05$ ), y a los 13 meses sólo esas diferencias son significativas para el grupo con recubrimiento ( $p < 0,05$ ), como se discutirá más adelante. En todos los grupos estudiados, el gas desaparece con el tiempo como resultado del proceso de difusión a través de las partes blandas (123). El análisis del gas que se acumula en las burbujas después de 40 días tras la implantación del material, no es sólo  $H_2$  como aparece en las ecuaciones. Ya en 1900, Payr hipotetizó que el gas acumulado era una mezcla de oxígeno e hidrógeno (27). Posteriormente Mc Bride demostró que correspondía a dióxido de carbono (5,6%), oxígeno (6.5%), hidrógeno (7,3%) y nitrógeno (80,6%) (32). Mc Bride explicó que el hidrógeno se absorbe tan rápido como se forma, mientras que el nitrógeno se absorbe más lentamente y es lo que forma las cavidades de gas adyacentes al Mg. Esta aseveración es confirmada por los estudios de Kuhlmann et al. quienes comprobaron que las burbujas de gas presentaban sólo una pequeña cantidad de gas hidrógeno incluso poco tiempo después de la formación de

las mismas. Esto significa que el hidrógeno se intercambia muy rápidamente después de su formación (24).

Algunos autores discuten si la formación de gas en el foco de fractura puede retrasar por una parte o alterar por otra al callo de la misma y en última instancia la consolidación de la fractura. Kraus defiende en su artículo de 2012 (16) que la formación del callo en la cortical medial es mayor debido a la acumulación de gas en dicha cortical que es el área de menor resistencia. Sin embargo, en una fractura de fémur sintetizada con estabilidad relativa, el callo de fractura siempre va a ser hipertrófico y siempre mayor en la cortical medial porque ésta es la cortical que trabaja a compresión y la cortical externa a tracción (124). En la línea de la ley de Roux-Wolff, la formación de hueso está guiada por fuerzas mecánicas y el hueso tiene la capacidad de adaptar su arquitectura a las cargas externas (14,125).

Más recientemente Huiskes (126) hace una simulación matemática sobre la estructura ósea y su adaptación biológica a la carga mecánica a la que se le somete. Demuestra y valida los estudios de Wolf mediante microTC y microFEA (análisis de los elementos finitos). En nuestro estudio, en ninguno de los casos existe una pseudoartrosis y la forma del callo ósea es homogénea para todos los grupos, no dando lugar a la sospecha clínica de alteraciones en el mismo secundarias al gas formado. Por tanto, el gas formado en la biodegradación de la AZ31 no es causante de alteraciones en la morfología del callo de fractura ni supone un retraso para la consolidación ósea (11).

La reacción de corrosión de la AZ31 comienza en forma de picaduras en la superficie del material (fig. 4.21) y progresa hacia el interior. En las imágenes a mayor aumento observamos con claridad la morfología de la corrosión en forma de picaduras en el implante (fig 4.21), y cómo se depositan los productos de la biodegradación alrededor del mismo, entre la AZ31y el tejido óseo neoformado. Las imágenes longitudinales, obtenidas en algunas muestras, corroboran la integridad del material en su parte central (figura 4.22) y nos localizan el implante dentro de la cavidad medular (figura 4.22). No se evidencia este ataque corrosivo por picaduras en la parte central hasta el mes 13 (figura 4.23), cuando el material muestra una biodegradación importante. La biocorrosión de la AZ31 insertada, en femures de rata como varilla endoprotésica, es por tanto bastante homogénea durante todo el tiempo de ensayo en contraposición con lo encontrado en otros trabajos (111).

Cuantificando el proceso de biodegradación a través de los estudios histomorfométricos se vio que al mes el porcentaje de material reabsorbido era del 24,28% de media. La biocorrosión que se produce no altera su estructura central y progresa en base a una corrosión por picaduras que comienza en su superficie. A los 9 meses, llevando ya consolidadas las fracturas 4 meses, se ha reabsorbido el 41,85% de la AZ31 con su estructura central conservada; a 13 meses el 46,66% (127). La reabsorción de más del 40% a los 9 meses no nos permite afirmar que este material sea adecuado para la osteosíntesis de huesos sometidos a cargas importantes, por la posibilidad de pérdida de propiedades mecánicas.

La capa de fluoruro de magnesio que en los estudios *in vitro* demostró tener una alta eficacia en la reducción de la tasa de corrosión del AZ31 (84) no ha reducido la corrosión del implante en nuestro estudio (128–131). Si bien la biodegradación inicial (1 mes) es semejante en las varillas con y sin capa, la tasa de biodegradación a 13 meses es estadísticamente significativa y mayor en el caso de las varillas que tenían capa de fluoruro (figura 4.25), datos que concuerdan con los obtenidos en los ensayos en calota, como se comentó anteriormente (tabla 4.2). Estos resultados están también en consonancia con los estudios de Thoman que encuentra que después de seis meses el volumen de implante recubierto biodegradado era un 13 % más alto que para el material sin recubrir (111).

La capa protectora de fluoruro de magnesio es en un principio compacta, uniforme y estable (figura 4.3). En medio fisiológico (pH neutro) pierde estabilidad con el tiempo y comienzan a aparecer (figura 2.22) pequeños defectos, algún poro y dado su carácter cerámico, la presencia de finas grietas (132).

A través de estos pequeños defectos los fluidos fisiológicos, por difusión penetran y pueden llegar a la base del sustrato metálico, donde se inicia el ataque corrosivo. Una vez iniciado el ataque la corrosión se acelera por la diferencia de potenciales entre material recubierto y material desnudo. Gu (51) describe este mecanismo en la aleación AZ31 *in vitro* y está de acuerdo con Wang (133,134) que asegura que la corrosión se acelera si la capa es destruida localmente. Nuestros resultados siguen la línea de dichos autores ya que la diferencia de potencial que se

establece entre zonas protegidas con capa en la aleación AZ31 (900mV Figura 4.5 ) y las zonas sin capa (300mV figura 4.5 ) da lugar a pilas de corrosión galvánicas que aceleran la corrosión de la aleación AZ31 recubierta con respecto a la misma aleación sin recubrir, donde estas pilas de corrosión galvánica, no son tan activas. De ahí que con el tiempo los datos histomorfométricos y de biodegradación muestren a tiempos largos de experimentación (13 meses) un porcentaje de biodegradación mayor en las muestras de AZ31 recubiertas con capa de fluoruro de magnesio, con respecto a la AZ31 sin recubrir (figura 4.25).

Los buenos resultados encontrados *in vitro* con la AZ31 recubierta (54,88,135) no tienen correspondencia en la experimentación *in vivo*. Nuevamente aparece la cuestión ampliamente debatida hasta qué punto se reproduce *in vitro* la situación del magnesio y sus aleaciones *in vivo* (103) dado que *in vivo* existen muchos condicionantes fisiológicos que no hacen comparables los estudios *in vitro*. En ellos no podemos introducir variables como el taponamiento electroquímico de las proteínas, ni la difusión a través de las membranas, ni los procesos de alteración muy localizado del pH etc. Una variable que ha sido poco estudiada es el espesor de electrólito que baña el implante.

Este espesor de electrólito que rodea al implante en el lugar de implantación, determina una velocidad de biodegradación distinta. Este punto se abordará con mayor detalle más adelante.



Como conclusión se podría asegurar que, a la vista de los resultados obtenidos, la modificación de la AZ31 con la capa de fluoruro de magnesio no se ve justificada en la experimentación *in vivo*.

El **tercer requisito** apuntado para que la AZ31 sea un material de aplicación en la osteosíntesis de fracturas era permitir una regeneración ósea *ad integrum* lo que quiere decir que durante todo este tiempo de regeneración la AZ31 debe presentar una degradación a velocidad controlada hasta su desaparición completa (98,99).

En este estudio no se llegó a la degradación completa del material, por lo que no se conoce la cinética de la biodegradación del mismo más allá de los 13 meses, que correspondía según hemos visto aproximadamente a un 60% de biodegradación del mismo. En lo que se refiere a la restitución ósea completa, las imágenes del TC (figura 4.24) demuestran la capacidad de la remodelación ósea que permitió que los fémures fracturados tuvieran a los 9 y 13 meses una morfología similar a la de los que no habían sido fracturados (136).

El equilibrio que se buscaba entre la consolidación ósea y la biodegradación de la aleación AZ31 parece conseguirse sin dificultad para el grupo de ratas fracturadas estudiado (137–139)

### 3.- Validar el modelo matemático

Desde los modelos matemáticos es posible desarrollar hipótesis acerca de cómo trabaja un sistema con un mayor detalle. El análisis teórico aquí presentado pretende alcanzar una mayor comprensión de la corrosión *in vivo* de varillas intramedulares

insertadas en fémures de rata en las dos condiciones estudiadas sin fractura y con fractura.

En este apartado, dos aproximaciones complementarias, el modelo matemático por un lado junto con los resultados experimentales se combinan con el fin de identificar variables que afectan en la biodegradación *in vivo* de los implantes de magnesio y que han sido poco consideradas en la literatura científica.

La figura 5.5 muestra el mapa de potencial teórico de los implantes de magnesio en la cavidad medular teniendo en cuenta la diferente distribución de las partículas.

Los resultados matemáticos confirman que donde el espesor del electrolito es mayor, la reacción electroquímica es mayor y por tanto es allí donde se acumula mayor cantidad de gas.

Los resultados clínicos validaron y revelaron que la corrosión del implante es menor en el centro, donde el grosor del electrolito es menor, que en los extremos, donde dicho grosor es mayor. Además, si existe fractura, la cortical está rota y el implante está en contacto con las partes blandas que rodean al hueso, por tanto más irrigado que el hueso.

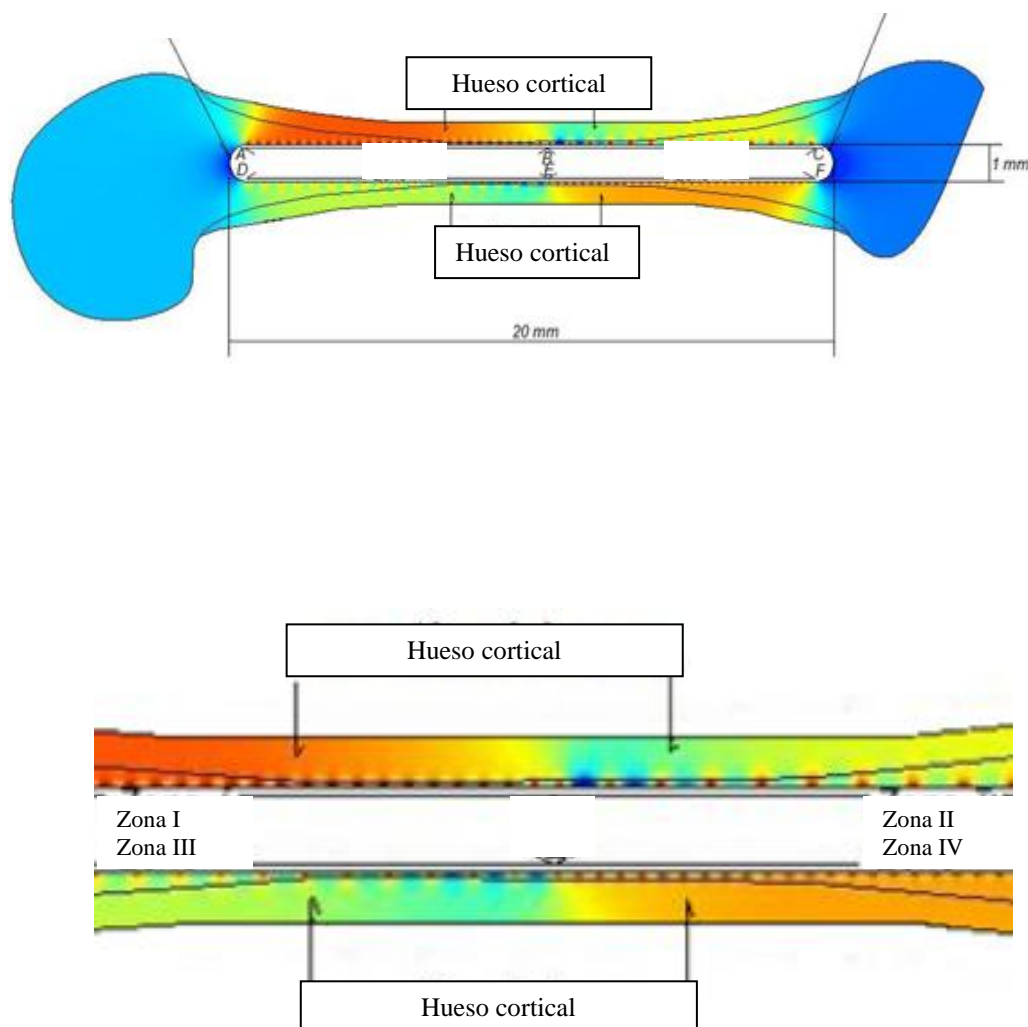


Figura 5.5.-Distribución de potencial resolviendo la ecuación de Laplace en el dominio usado para representar la sección transversal de un femur de rata con un implante insertado en la cavidad medular

#### **4.— Respuesta toxicológica y sistémica de los elementos metálicos biodegradados.**

Hasta aquí se ha llevado a cabo un estudio y análisis de la respuesta local tanto del material insertado como de la consolidación ósea con el tiempo en las ratas con fractura diafisaria. Si bien la AZ31 cumple todos los requisitos mecánicos, electroquímicos, de biocompatibilidad así como de ser capaz de mantener tanto las propiedades mecánicas, (cuando no se requieran cargas importantes) como las de biodegradación hasta consolidar la fractura totalmente, rectificar la calidad del hueso etc. La aleación en su proceso de biodegradación no sólo impregna el medio fisiológico de productos de corrosión del magnesio, sino que en menor proporción estos productos van acompañados de productos de corrosión de los otros componentes de la aleación como son el aluminio, zinc, manganeso (procedente de la contaminación en la fabricación de la aleación).

En la tabla 4.7 se puede apreciar como estos elementos analizados en los distintos órganos (sumatorio de todos los órganos) presentan un mayor nivel en las ratas portadoras de implantes AZ31 con respecto a las ratas control, lo que demuestra que los productos de biodegradación de la AZ31 pueden difundir por el organismo hasta alcanzar diversos órganos.

También se puede apreciar en la tabla 4.7 que de todos los elementos analizados Mg, Al, Zn, Mn sólo el Al presenta una diferencia estadísticamente significativa.

Yuen (140) establece límites máximos teóricos anuales para implantes degradables de aleaciones de Mg, sin que se observen efectos adversos en el organismo. Siguiendo los criterios de Yuen hemos evaluado si los implantes de AZ31 ensayados (de aproximadamente 28 mg) están dentro de los márgenes de seguridad establecidos por este investigador.

El elemento que en la biodegradación se encuentra en mayor proporción es el magnesio (dado que el implante tiene un contenido del 96% de magnesio en la aleación). La toxicidad del magnesio ha sido ampliamente estudiada y aunque cuanto el Mg, ha sido administrado a muy altas dosis puede presentar efectos tóxicos o incluso mortales, lo cierto es que incrementos moderados de su concentración no causan toxicidad ni en cultivos celulares ni en el cuerpo humano. En otros estudios, se ha demostrado como las aleaciones de magnesio implantadas in vivo promueven el crecimiento óseo en sus inmediaciones.

Como su liberación, en el proceso de biodegradación de la AZ31 es de forma continuada, los niveles de Mg en sangre son regulados por el riñón, y el exceso es excretado por la orina. También parte del magnesio ha podido pasar al hueso, ya que el esqueleto actúa como captador de este metal (cerca del 50% del magnesio del cuerpo se almacena en los huesos).

Según Yuen (140) se considera tolerable insertar anualmente en humanos implantes de 64-73 g de Mg. En el diseño experimental animal propuesto en esta investigación, equivaldría a implantes con 180-200 mg de Mg en un año. Nuestro implante de AZ31 viene a contener menos de 27 mg de Mg, esto es decir 7 veces inferior a la dosis de seguridad propuesta por Yuen.

Respecto del Al, este elemento es potencialmente neurotóxico en humanos y animales de laboratorio y se ha demostrado su acumulación en órganos tales como cerebro, huesos, riñón, sangre. La dosis máxima tolerable de Al en ratas ha sido establecida de forma teórica en  $1.64 \cdot 10^{-2}$  mg / Kg peso / día (140). Como el análisis por WDXRF de nuestro implante da contenidos del 3.37%, el límite teórico sería 35.5 mg / año, unas 1.27 veces el peso de nuestro implante. Nuestros datos indican que al cabo de un año, tan sólo el 60% del implante se ha desintegrado, por lo que la cantidad máxima de Al que habría pasado al organismo sería aún un 40% menor, incrementando de esa forma los márgenes de seguridad.

Puesto que el único elemento con un aumento significativo como resultado de la inserción del implante ha sido el Al y atendiendo a los posibles problemas de toxicidad relacionados con este elemento, se procedió a evaluar exhaustivamente su presencia en los distintos órganos. En la tabla 4.8 se presenta el contenido de Al en los distintos órganos, en ella se puede apreciar que el único órgano donde las diferencias son significativas son en el bazo. Esto coincide con otros trabajos donde se observa que el bazo es el órgano donde se producen las mayores acumulaciones de trazas con respecto al resto de órganos analizados con diversos tipos de implantes, probablemente debido a su relación con el sistema inmune.

La entrada del Al al cerebro no es fácil, pues la barrera hematoencefálica tiende a impedir su paso. Como contrapartida, la tasa de desaparición del Al del cerebro es baja y se sospecha que puede concentrarse allí a lo largo de toda la vida. Nuestros datos, con un valor de 3.11 ppm (peso seco) en cerebro podrían considerarse dentro de la media, aunque debemos recomendar precaución con el número y tamaño de implantes insertados para no sobrepasar el límite de seguridad.

Estos resultados concuerdan con la información existente sobre estudios en medicación parenteral donde en adultos sanos un 99% de este Al es eliminado por vía renal (por la orina) y minoritariamente también por vía hepática (por la bilis). En estudios de inyección directa de Al<sup>26</sup> en humanos, tras 24 horas sólo el 0.5% permanecía en sangre por lo que el sistema de eliminación es muy eficiente. Este eficaz funcionamiento del sistema excretor junto a la deposición de productos de corrosión en las proximidades del implante son los dos principales mecanismos que explican la relativamente baja concentración de Al en los órganos estudiados, en línea con lo que apunta Witte (24).

A continuación se pasa analizar el Zn y el Mn, elementos metálicos presentes en la aleación AZ31, en pequeña proporción el Zn o proveniente de contaminación como es el caso del Mn.

La dosis máxima tolerable de Mn ha sido establecida de forma teórica en  $7 \times 10^{-3}$  mg / Kg peso/día. Considerando el contenido de Mn (0.22 %) el límite teórico admisible sería de 232 mg/año. Este valor corresponde a unas 8,3 veces el peso de nuestro implante. Si consideramos este elemento, desde el punto de vista de toxicidad se ha evidenciado que el Mn está considerado como uno de los metales menos tóxicos cuando es consumido vía oral, pero bastante tóxico cuando es administrado vía inhalación. El Mn normalmente es excretado vía heces tras ser almacenado en la bilis por el hígado.

Según Yuen (140) la dosis máxima tolerable de Zn ha sido establecida de forma teórica en  $5,53 \times 10^{-2}$  mg / Kg peso/ día. Como nuestro implante de AZ31 presenta contenidos del 0,78%, el límite teórico sería 517 mg/año, unas 18,5 veces el peso del

material de la aleación AZ31 de este estudio. Hay que considerar que el Zn es un elemento altamente esencial para el organismo y que causa problemas la deficiencia del mismo.

El aumento de trazas metálicas con el tiempo se produce para el Mg, Al y Mn habiendo una estabilización del Zn entre los 9 y 13 meses (tabla 4.9). No obstante, este incremento con el tiempo no es estadísticamente significativo, excepto para el Al, que además en el último periodo (9 a 13 meses) sigue presentando incrementos. Witte (77) encuentra en conejos una escasa migración de partículas de Al a los tejidos cercanos al lugar del implante, y una gradual desaparición de Al entre 3 y 6 meses. Los resultados de nuestras investigaciones son difíciles de contrastar dado que normalmente la experimentación en animales no suele ser de larga duración como nuestros ensayos, prolongados hasta los 13 meses. En este sentido el trabajo es pionero en ofrecer estos datos.

De los resultados obtenidos y de los cálculos efectuados parece razonable descartar que el Mg, Mn y Zn en los niveles empleados en los implantes de AZ31 de este trabajo puedan producir toxicidad, en el modelo animal planteado. Que el Al en cerebro no produce concentraciones estadísticamente significativas y que es eliminado prioritariamente por bazo.



**Limitaciones del estudio**

---



Este trabajo presenta las siguientes limitaciones:

1. La caracterización de las propiedades mecánicas del material se realizaron al comienzo del estudio. No se realizaron pruebas para conocer estas propiedades a tiempos intermedios de la corrosión del material.
2. Los animales se sacrificaron a 13 meses cuando el material tenía una degradación del 53%. No conocemos cuánto tiempo necesita para su degradación completa.
3. En la actualidad los  $\mu$ TC dan imágenes de mayor resolución que las conseguidas con el TC convencional utilizado en este estudio.
4. La medida del gas en las ratas con fractura siempre ha sido por defecto.







1.-La aleación AZ31 muestra unas *propiedades mecánicas* adecuadas, en la osteosíntesis de huesos no sometidos a carga, además de un excelente comportamiento frente a la *corrosión y viabilidad celular*.

2.-La aleación AZ31 es un material *biocompatible con propiedades osteoinducturas*. La modificación superficial  $MgF_2$  es también bien tolerada por el organismo.

3.-El gas producido en el proceso de biodegradación de la AZ31 se intercambia y difunde rápidamente *no alterando la formación ni la morfología del calo óseo*.

4.-La fractura consolida en el 100% de los animales *manteniendo sus propiedades mecánicas* durante todo el proceso de consolidación.

Existe un equilibrio entre la biodegradación de la AZ31 y la consolidación ósea que permite proponer el uso de la aleación AZ31 como material de osteosíntesis.

5.- El modelo matemático propuesto evidencia que *el espesor del electrolito* es un factor clave en el proceso de corrosión galvánica del magnesio.

6.-Los niveles de trazas metálicas alcanzados a nivel sistémico, procedentes del proceso de biodegradación de la AZ31, *no producen toxicidad* en el modelo animal planteado.





## **Bibliografía**

---



1. Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: a review. *Acta Biomater. Acta Materialia*. 2010;6(5):1680–92.
2. Andani MT, Shayesteh Moghaddam N, Haberland C, Dean D, Miller MJ, Elahinia M. Metals for bone implants. Part 1. Powder metallurgy and implant rendering. *Acta Biomater*. 2014;10(10) :4058-70
3. Hampp C, Angrisani N, Reifenrath J, Bormann D, Seitz J-M, Meyer-Lindenberg A. Evaluation of the biocompatibility of two magnesium alloys as degradable implant materials in comparison to titanium as non-resorbable material in the rabbit. *Mater Sci Eng C* . 2013;33(1):317–26.
4. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. 2008;29(20):2941–53.
5. Claes LE. mechniccal characterization of biodegradable Implants. *Clin Mater*. 1992;10:41–6.
6. Gogolewski S. Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. *Injury*. 2000;31 Suppl 4:28–32.
7. Wei Z, Tian P, Liu X, Zhou B. In vitro degradation, hemolysis, and cytocompatibility of PEO/PLLA composite coating on biodegradable AZ31 alloy. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;103(2):342–54.

8. Wu W, Chen S, Gastaldi D, Petrini L, Mantovani D, Yang K, et al. Experimental data confirm numerical modeling of the degradation process of magnesium alloys stents. *Acta Biomater.* 2013;9(10):8730–9.
9. Gunde P, Hänzi a. C, Sologubenko a. S, Uggowitzer PJ. High-strength magnesium alloys for degradable implant applications. *Mater Sci Eng A.* 2011;528(3):1047–54.
10. Hallab N, Merritt K, Jacobs JJ. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A(3):428–36.
11. Wu W, Chen S, Gastaldi D, Petrini L, Mantovani D, Yang K, et al. Experimental data confirm numerical modeling of the degradation process of magnesium alloys stents. *Acta Biomater.* 2013;9(10):8730–9.
12. Witte F, Hort N, Vogt C, Cohen S, Kainer KU, Willumeit R, et al. Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. *Curr Opin Solid State Mater Sci.* 2008;12(5-6):63–72.
13. Alvarez-Lopez M, Pereda MD, del Valle JA, Fernandez-Lorenzo M, Garcia-Alonso MC, Ruano OA, et al. Corrosion behaviour of AZ31 magnesium alloy with different grain sizes in simulated biological fluids. *Acta Biomater.* 2010;6(5):1763–71.
14. Roux W. *DEr Kampf der Teile im Organismus.* Leipzig: Engelmann; 1881.

15. Walker J, Shadanbaz S, Woodfield TBF, Staiger MP, Dias GJ. Review Article  
Magnesium biomaterials for orthopedic application : A review from a biological  
perspective. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014;102 (6):1316–31.
16. Kraus T, Fischerauer SF, Hänzli AC, Uggowitzer PJ, Löffler JF, Weinberg AM.  
Magnesium alloys for temporary implants in osteosynthesis: in vivo studies of  
their degradation and interaction with bone. *Acta Biomater. Acta Materialia*.  
2012;8(3):1230–8.
17. Chat L. Cited by since 1996 The mechanical properties of cortical bone. *J Bone  
Joint Surg Am*. 1974;56(5):1001-1022.
18. Reifenrath J, Bormann D, Meyer-lindenberg A. Magnesium Alloys as Promising  
Degradable Implant Materials in Orthopaedic Research. INTECH Open Access  
Publisher, 2011.
19. Kirkland NT. Magnesium biomaterials: past, present and future. *Corros Eng Sci  
Technol*. 2012;47(5):322–8.
20. Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as  
orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials*. 2006;27(9):1728–34.
21. Erdmann N, Bondarenko A, Hewicker-Trautwein M, Angrisani N, Reifenrath J,  
Lucas A, et al. Evaluation of the soft tissue biocompatibility of MgCa0.8 and  
surgical steel 316L in vivo: a comparative study in rabbits. *Biomed Eng Online*.  
BioMed Central Ltd; 2010;9(1):63.

22. Evertz F, Hauser H, Müller PP, Kietzmann M, Maier HJ, Glasmacher B.  
Magnesium as a biomaterial and its biological interactions. Biomedical Engineering/biomedizinische Technik, 2013.
23. Gu X-N, Zheng Y-F. A review on magnesium alloys as biodegradable materials. Front Mater Sci China. 2010;4(2):111–5.
24. Kuhlmann J, Bartsch I, Willbold E, Schuchardt S, Holz O, Hort N, et al. Fast escape of hydrogen from gas cavities around corroding magnesium implants. Acta Biomater. Acta Materialia Inc.; 2013;9(10):8714–21.
25. Farraro KF, Kim KE, Woo SL-Y, Flowers JR, McCullough MB. Revolutionizing orthopaedic biomaterials: The potential of biodegradable and bioresorbable magnesium-based materials for functional tissue engineering. J Biomech. Elsevier; 2014 Jun 27;47(9):1979–86.
26. ED P. Blutgefäß- und Nervennaht. 1901;28(April 1900):31–7.
27. Payr E. Beiträge zur Technik der Blutgefäß- und Nervennaht nebst Mittheilungen über die Verwendung eines resorbirbaren Metalles in der Chirurgie. Arch Klin Chir. 1900;62:67–93.
28. Lambotte. Lambotte A. Technique et indications de la prothèse perdue dans la traitement des fractures. Presse Med Belge 1909;17:321 – 3. 1909;17:321–3.
29. Lambotte. Lambotte A. L'utilisation du magnesium comme materiel perdu dans l'osteosynthese. Bull Mem Soc Nat Cir. 1932;28:1325 – 1334. Bull Mem Soc Nat Cir. 1932;28:1325–34.

- 
30. Verbrugge J. Verbrugge J. L'utilisation d u magnésium dans le traitement chirurgical des fractures. Bull Mem Soc Nat Cir. 1937;59:813–23.
  31. Chao AH, Chang DW, Shuaib SW, Hanasono MM. The effect of neoadjuvant versus adjuvant irradiation. Plast Reconstr Surg . 2012;129(3):675–82.
  32. Mc Bride E. Absorbable metal in bone surgery. bone surg. 1938;111:2464.
  33. Kammer C. magnesium Taschenbuch. 2000;
  34. Kubásek J, Vojtěch D, Lipov J, Ruml T. Structure, mechanical properties, corrosion behavior and cytotoxicity of biodegradable Mg-X (X=Sn, Ga, In) alloys. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2013;33(4):2421–32.
  35. Saris NE, Mervaala E, Karppanen H, Khawaja J a, Lewenstam a. Magnesium. An update on physiological, clinical and analytical aspects. Clin Chim Acta. 2000;294(1-2):1–26.
  36. Witte F, Fischer J, Nellesen J, Crostack H-A, Kaese V, Pisch A, et al. In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys. Biomaterials. 2006;27(7):1013–8.
  37. Song G, Song S. A Possible Biodegradable Magnesium Implant Material. Adv Eng Mater. 2007;9(4):298–302.
  38. Song G. Recent Progress in Corrosion and Protection of Magnesium Alloys. Adv Eng Mater. WILEY-VCH Verlag; 2005;7(7):563–86.

39. Atrens A, Song G-L, Liu M, Shi Z, Cao F, Dargusch MS. Review of Recent Developments in the Field of Magnesium Corrosion. *Adv Eng Mater.* 2015 .
40. Song Y, Shan D, Han E-H. A novel biodegradable nicotinic acid/calcium phosphate composite coating on Mg–3Zn alloy. *Mater Sci Eng C.* 2013;33(1):78–84.
41. Atrens A, Dietzel W. The Negative Difference Effect and Unipositive Mg+. *Adv Eng Mater.* 2007;9(4):292–7.
42. Zhou WR, Zheng YF, LeeFlang MA, Zhou J. Mechanical property, biocorrosion and in vitro biocompatibility evaluations of Mg-Li-(Al)-(RE) alloys for future cardiovascular stent application. *Acta Biomater.* 2013 ;9(10):8488–98.
43. Zeng R, Zhang J, Huang W, Dietzel W, Kainer KU, Blawert C, et al. Review of studies on corrosion of magnesium alloys. *Trans Nonferrous Met Soc China.* 2006;16:s763–71.
44. Pérez-Prado MT, del Valle JA, Contreras JM, Ruano OA. Microstructural evolution during large strain hot rolling of an AM60 Mg alloy. *Scr Mater* [Internet]. 2004;50(5):661–5.
45. Carboneras M, Pérez-Maceda BT, del Valle JA, García-Alonso MC, Lozano RM, Escudero ML. In vitro performance of magnesium processed by different routes for bone regeneration applications. *Mater Lett.* 2011;65(19-20):3020–3.
46. Del Valle JA, Pérez-Prado MT, Ruano OA. Texture evolution during large-strain hot rolling of the Mg AZ61 alloy. *Mater Sci Eng A .* 2003;355(1-2):68–78.



- 
47. Xin R, Luo Y, Zuo A, Gao J, Liu Q. Texture effect on corrosion behavior of AZ31 Mg alloy in simulated physiological environment. *Mater Lett*. 2012;72:1–4.
  48. Mueller W-D, Lucia Nascimento M, Lorenzo de Mele MF. Critical discussion of the results from different corrosion studies of Mg and Mg alloys for biomaterial applications. *Acta Biomater. Acta Materialia*. 2010;6(5):1749–55.
  49. Bartsch I, Willbold E, Rosenhahn B, Witte F. Non-invasive pH determination adjacent to degradable biomaterials in vivo. *Acta Biomater*. 2014;10(1):34–9.
  50. Liu XL, Zhou WR, Wu YH, Cheng Y, Zheng YF. Effect of sterilization process on surface characteristics and biocompatibility of pure Mg and MgCa alloys. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2013;33(7):4144–54.
  51. Gu X, Zheng Y, Cheng Y, Zhong S, Xi T. In vitro corrosion and biocompatibility of binary magnesium alloys. *Biomaterials* [Elsevier Ltd; 2009;30(4):484–98].
  52. Abdal-hay A, Barakat N a. M, Lim JK. Hydroxyapatite-doped poly(lactic acid) porous film coating for enhanced bioactivity and corrosion behavior of AZ31 Mg alloy for orthopedic applications. *Ceram Int. Elsevier*; 2013;39(1):183–95.
  53. Badar M, Lünsdorf H, Evertz F, Rahim MI, Glasmacher B, Hauser H, et al. The formation of an organic coat and the release of corrosion microparticles from metallic magnesium implants. *Acta Biomater*. 2013;9(7):7580–9.
  54. Gu Y, Bandopadhyay S, Chen C, Ning C, Guo Y. Long-term corrosion inhibition mechanism of microarc oxidation coated AZ31 Mg alloys for biomedical applications. *Mater Des*. 2013;46:66–75.

55. Carboneras M, Hernández LS, del Valle JA, García-Alonso MC, Escudero ML. Corrosion protection of different environmentally friendly coatings on powder metallurgy magnesium. *J Alloys Compd.* 2010;496(1-2):442–8.
56. Al-Abdullat Y, Tsutsumi S, Nakajima N, Ohta M, Kuwahara H, Ikeuchi K. Surface Modification of Magnesium by  $\text{NaHCO}_3$  and Corrosion Behavior in Hank's solution for New Biomaterial Applications. *MATERIALS TRANSACTIONS.* 2001. p. 1777–80.
57. Hornberger H, Virtanen S, Boccaccini AR. Biomedical coatings on magnesium alloys – A review. *Acta Biomaterialia* 2012;8:2442–55.
58. Hort N, Huang Y, Fechner D, Störmer M, Blawert C, Witte F, et al. Magnesium alloys as implant materials – Principles of property design for Mg – RE alloys q. *Acta Biomaterialia* 2010;6:1714–25.
59. Robinson D a, Griffith RW, Shechtman D, Evans RB, Conzemius MG. In vitro antibacterial properties of magnesium metal against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Biomater.* 2010;6(5):1869–77.
60. Sanchez AHM, Luthringer BJC, Feyerabend F, Willumeit R. Mg and Mg alloys: How comparable are in vitro and in vivo corrosion rates? - A Review. *Acta Biomater.* 2014;13:16–31.

- 
61. Walker J, Shadanbaz S, Woodfield TBF, Staiger MP, Dias GJ. The in vitro and in vivo evaluation of the biocompatibility of Mg alloys. *Biomed Mater*. 2014;9(1):15006.
  62. Huehnerschulte TA, Angrisani N, Rittershaus D, Bormann D, Windhagen H, Meyer-Lindenberg A. In Vivo Corrosion of Two Novel Magnesium Alloys ZEK100 and AX30 and Their Mechanical Suitability as Biodegradable Implants. *Materials (Basel)*. 2011;4(12):1144–67.
  63. Huehnerschulte TA, Reifenrath J, von Rechenberg B, Dziuba D, Seitz JM, Bormann D, et al. In vivo assessment of the host reactions to the biodegradation of the two novel magnesium alloys ZEK100 and AX30 in an animal model. *Biomed Eng Online*. 2012;11(1):14.
  64. Kirkland NT, Birbilis N, Staiger MP. Assessing the corrosion of biodegradable magnesium implants: a critical review of current methodologies and their limitations. *Acta Biomater*. 2012;8(3):925–36.
  65. Hirano S, Suzuki KT. Exposure, metabolism, and toxicity of rare earths and related compounds. *Environ Health Perspect*. 1996 Mar;104 Suppl (15):85–95.
  66. Seitz J-M, Eifler R, Bach F-W, Maier HJ. Magnesium degradation products: Effects on tissue and human metabolism. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(10):3744–53.
  67. Li Y, Wen C, Mushahary D, Sravanthi R, Harishankar N, Pande G, et al. Mg-Zr-Sr alloys as biodegradable implant materials. *Acta Biomater*; 2012;8(8):3177–88.

68. Pérez-Prado MT, Valle del, Ruano OA. Grain refinement of Mg–Al–Zn alloys via accumulative roll bonding. *Scr Mater*. 2004;51(11):1093–7.
69. Drynda A, Seibt J, Hassel T, Bach FW, Peuster M. Biocompatibility of fluoride-coated magnesium-calcium alloys with optimized degradation kinetics in a subcutaneous mouse model. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(1):33–43.
70. Auer J a, Goodship A, Arnoczky S, Pearce S, Price J, Claes L, et al. Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use. *BMC Musculoskelet Disord*. 2007;8:72.
71. Yushkevich P.A., Piven J., Hazlett H.C., Smith R.G., Ho G., Gee J.C. GG. Use-guide 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage*. 2006;31(3):1116–28.
72. Del Valle JA, Ruano OA. Effect of annealing treatments on the anisotropy of a magnesium alloy sheet processed by severe rolling. *Mater Lett*. 2009;63(17):1551–4.
73. Windhagen H, Radtke K, Weizbauer A, Diekmann J, Noll Y, Kreimeyer U, et al. Biodegradable magnesium-based screw clinically equivalent to titanium screw in hallux valgus surgery: short term results of the first prospective, randomized, controlled clinical pilot study. *Biomed Eng Online*. BioMedical Engineering OnLine; 2013;12(1):62.

74. Del Valle JA, Carreño F, Ruano OA. Influence of texture and grain size on work hardening and ductility in magnesium-based alloys processed by ECAP and rolling. *Acta Mater.* 2006;54(16):4247–59.
75. Del Valle J a., Ruano O a. Superplasticity in a magnesium alloy prepared with bimodal grain size distributions developed by dynamic recrystallisation. *Mater Lett [Internet]*. 2008;62(19):3391–4.
76. Anawati, Hidetaka Asoh and SO. Effect of alloying element Ca and anodization on corrosion resistance and bioactivity of AZ61 alloy. 224th ECS Meet © 2013 Electrochem Soc. 2008;263:1843.
77. Willbold E, Gu X, Albert D, Kalla K, Bobe K, Brauneis M, et al. Effect of the addition of low rare earth elements (lanthanum, neodymium, cerium) on the biodegradation and biocompatibility of magnesium. *Acta Biomater [Internet]*. 2015;11:554–62.
78. Del Valle JA, Pérez-Prado MT, Ruano OA. Accumulative roll bonding of a Mg-based AZ61 alloy. *Mater Sci Eng A [Internet]*. 2005;410-411:353–7.
79. Pérez-Prado M., del Valle J., Ruano O. Effect of sheet thickness on the microstructural evolution of an Mg AZ61 alloy during large strain hot rolling. *Scr Mater [Internet]*. 2004;50(5):667–71.
80. Feyerabend F, Fischer J, Holtz J, Witte F, Willumeit R, Drücker H, et al. Evaluation of short-term effects of rare earth and other elements used in magnesium alloys

- on primary cells and cell lines. Acta Biomater. Acta Materialia Inc.;  
2010;6(5):1834–42.
81. Shadanbaz S, Dias GJ. Calcium phosphate coatings on magnesium alloys for biomedical applications: a review. Acta Biomater. Acta Materialia Inc.;  
2012;8(1):20–30.
  82. Smith MR, Atkinson P, White D, Piersma T, Gutierrez G, Rossini G, et al. Design and assessment of a wrapped cylindrical Ca-P AZ31 Mg alloy for critical-size ulna defect repair. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2012;100(1):206–16.
  83. Razavi M, Fathi M, Savabi O, Vashae D, Tayebi L. In vivo assessments of bioabsorbable AZ91 magnesium implants coated with nanostructured fluoridated hydroxyapatite by MAO/EPD technique for biomedical applications. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2015;48:21–7.
  84. Carboneras M, Iglesias C, Pérez-Maceda BT, Del Valle J a., García-Alonso MC, Alobera M a., et al. Comportamiento frente a la corrosión y biocompatibilidad *in vitro/in vivo* de la aleación AZ31 modificada superficialmente. Rev Metal. 2011;47(3):212–23.
  85. Chen S, Guan S, Chen B, Li W, Wang J, Wang L, et al. Corrosion behavior of TiO<sub>2</sub> films on Mg–Zn alloy in simulated body fluid. Appl Surf Sci. Elsevier B.V.;  
2011;257(9):4464–7.
  86. Yassuda DH, Costa NFM, Fernandes GO, Alves GG, Granjeiro JM, Soares GD a. Magnesium incorporation into  $\beta$ -TCP reduced its in vivo resorption by

- 
- decreasing parathormone production. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(7):1986–93.
87. Yoshizawa S, Brown A, Barchowsky A, Sfeir C. Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation. *Acta Biomater*; 2014;10(6):2834–42.
88. Lozano RM, Pérez-Maceda BT, Carboneras M, Onofre-Bustamante E, García-Alonso MC, Escudero ML. Response of MC3T3-E1 osteoblasts, L929 fibroblasts, and J774 macrophages to fluoride surface-modified AZ31 magnesium alloy. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(10):2753–62.
89. Carboneras M, García-Alonso MC, Escudero ML. Biodegradation kinetics of modified magnesium-based materials in cell culture medium. *Corros Sci*. 2011;53(4):1433–9.
90. Mao L, Yuan G, Niu J, Zong Y, Ding W. In vitro degradation behavior and biocompatibility of Mg–Nd–Zn–Zr alloy by hydrofluoric acid treatment. *Mater Sci Eng* . 2013;33(1):242–50.
91. Jang Y, Tan Z, Jurey C, Collins B, Badve A, Dong Z, et al. Systematic understanding of corrosion behavior of plasma electrolytic oxidation treated AZ31 magnesium alloy using a mouse model of subcutaneous implant. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 ;45:45–55.

92. Fischerauer SF, Kraus T, Wu X, Tangl S, Sorantin E, Hänni C, et al. In vivo degradation performance of micro-arc-oxidized magnesium implants: a micro-CT study in rats. *Acta Biomater* [Internet]. 2013 ;9(2):5411–20.
93. Komatsu DE, Warden SJ. The control of fracture healing and its therapeutic targeting: improving upon nature. *J Cell Biochem*. 2010;109(2):302–11.
94. Dziuba D, Meyer-Lindenberg A, Seitz JM, Waizy H, Angrisani N, Reifenrath J. Long-term in vivo degradation behaviour and biocompatibility of the magnesium alloy ZEK100 for use as a biodegradable bone implant. *Acta Biomater*. 2013;9(10):8548–60.
95. Waizy H, Seitz J-M, Reifenrath J, Weizbauer A, Bach F-W, Meyer-Lindenberg A, et al. Biodegradable magnesium implants for orthopedic applications. *J Mater Sci*. 2012;48(1):39–50.
96. Janning C, Willbold E, Vogt C, Nellesen J, Meyer-Lindenberg a, Windhagen H, et al. Magnesium hydroxide temporarily enhancing osteoblast activity and decreasing the osteoclast number in peri-implant bone remodelling. *Acta Biomater*. 2010;6(5):1861–8.
97. Schmidhammer R, Zandieh S, Mittermayr R, Pelinka LE, Leixnering M, Hopf R, et al. Assessment of bone union/nonunion in an experimental model using microcomputed technology. *J Trauma*. 2006;61(1):199–205.
98. Buck DW, Dumanian G a. Bone biology and physiology: Part I. The fundamentals. *Plast Reconstr Surg*. 2012;129(6):1314–20.



- 
99. Buck DW, Dumanian G a. Bone biology and physiology: Part II. Clinical correlates. *Plast Reconstr Surg.* 2012;129(6):950e – 956e.
  100. frost HM. the biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *clin Orthop Relat Res.* 1989;248:294–309.
  101. Keim S, Brunner JG, Fabry B, Virtanen S. Control of magnesium corrosion and biocompatibility with biomimetic coatings. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011;96(1):84–90.
  102. Yu K, Chen L, Zhao J, Wang R, Dai Y, Huang Q. In vivo biocompatibility and biodegradation of a Mg-15 % Ca  $3 ( PO 4 ) 2$  composite as an implant material. *Materials letter.* 2013;98:22–5.
  103. Chou D-T, Hong D, Saha P, Ferrero J, Lee B, Tan Z, et al. In vitro and in vivo corrosion, cytocompatibility and mechanical properties of biodegradable Mg-Y-Ca-Zr alloys as implant materials. *Acta Biomater.* 2013;9(10):8518–33.
  104. Guo H, Ma Y, Wang J, Wang Y, Dong H, Hao Y. Corrosion behavior of micro-arc oxidation coating on AZ91D magnesium alloy in NaCl solutions with different concentrations. *Trans Nonferrous Met Soc China.* 2012 ;22(7):1786–93.
  105. Gill P. Corrosion and Biocompatibility Assessment of Magnesium Alloys. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2012;03(01):10–3.
  106. Beil FT, Barvencik F, Gebauer M, Beil B, Pogoda P, Rueger JM, et al. Effects of increased bone formation on fracture healing in mice. *J Trauma.* 2011;70(4):857–62.

107. Ullmann B, Reifenrath J, Dziuba D, Seitz J-M, Bormann D, Meyer-Lindenberg A.  
In Vivo Degradation Behavior of the Magnesium Alloy LANd442 in Rabbit Tibiae.  
Materials (Basel). 2011;4(12):2197–218.
108. Virtanen S. Biodegradable Mg and Mg alloys: Corrosion and biocompatibility.  
Mater Sci Eng B. 2011;176(20):1600–8.
109. Willbold E, Witte F. Histology and research at the hard tissue-implant interface  
using Technovit 9100 New embedding technique. Acta Biomater.  
2010;6(11):4447–55.
110. Witte F, Ulrich H, Palm C, Willbold E. Biodegradable magnesium scaffolds : Part  
II : Peri-implant bone remodeling. J Biomedical Mater Reserch part A. 2007;  
:757-65.
111. Thomann M, Krause C, Angrisani N, Bormann D, Hassel T, Windhagen H, et al.  
Influence of a magnesium-fluoride coating of magnesium-based implants  
(MgCa0.8) on degradation in a rabbit model. J Biomed Mater Res A.  
2010;93(4):1609–19.
112. Willbold E, Kaya a. a., Kaya R a., Beckmann F, Witte F. Corrosion of magnesium  
alloy AZ31 screws is dependent on the implantation site. Mater Sci Eng B.  
2011;176(20):1835–40.
113. Castellani C, Lindtner R a, Hausbrandt P, Tschegg E, Stanzl-Tschegg SE, Zanoni G,  
et al. Bone-implant interface strength and osseointegration: Biodegradable

- magnesium alloy versus standard titanium control. *Acta Biomater.* 2011;7(1):432–40.
114. Erdmann N, Angrisani N, Reifenrath J, Lucas A, Thorey F, Bormann D, et al. Biomechanical testing and degradation analysis of MgCa0.8 alloy screws: a comparative in vivo study in rabbits. *Acta Biomater.* 2011;7(3):1421–8.
115. Lindtner RA, Castellani C, Tangl S, Zanoni G, Hausbrandt P, Tschegg EK, et al. Comparative biomechanical and radiological characterization of osseointegration of a biodegradable magnesium alloy pin and a copolymeric control for osteosynthesis. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2013;28:232–43.
116. Witte F, Kaese V, Haferkamp H, Switzer E, Meyer-Lindenberg a, Wirth CJ, et al. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. *Biomaterials.* 2005;26(17):3557–63.
117. Xu L, Zhang E, Yin D, Zeng S, Yang K. In vitro corrosion behaviour of Mg alloys in a phosphate buffered solution for bone implant application. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19(3):1017–25.
118. Witte F, Fischer J, Nellesen J, Vogt C, Vogt J, Donath T, et al. In vivo corrosion and corrosion protection of magnesium alloy LAE442. *Acta Biomater.* 2010;6(5):1792–9.
119. Bondarenko a, Angrisani N, Meyer-Lindenberg a, Seitz JM, Waizy H, Reifenrath J. Magnesium-based bone implants: immunohistochemical analysis of peri-

- implant osteogenesis by evaluation of osteopontin and osteocalcin expression. *J Biomed Mater Res A*. 2014;102(5):1449–57.
120. Chen Y, Xu Z, Smith C, Sankar J. Recent advances on the development of magnesium alloys for biodegradable implants. *Acta Biomater*. 2014 14;(1):1–5.
  121. Choudhary L, Raman RKS. Magnesium alloys as body implants: fracture mechanism under dynamic and static loadings in a physiological environment. *Acta Biomater*. 2012;8(2):916–23.
  122. García-Aznar JM, Kuiper JH, Gómez-Benito MJ, Doblaré M, Richardson JB. Computational simulation of fracture healing: influence of interfragmentary movement on the callus growth. *J Biomech*. 2007;40(7):1467–76.
  123. Mantovani D, Witte F. The attraction of a lightweight metal with mechanical properties suitable for many applications brought a renewed focus on magnesium alloys in the automotive and aerospace industries. *Acta Biomater*. 2010;6(5):1679.
  124. Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall E a, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, et al. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *J Histochem Cytochem*. 2006 ;54(11):1215–28.
  125. Wolff J. Das gesetz der trasformation der Knochen. springer; 1986.
  126. Huiskes R. If bone is the answer, then what is the question? *J Anat*. 2000 Aug;197, 2:145–56.

- 
127. Wilkins KE. Principles of fracture remodeling in children. *Injury*. 2005;36 Suppl 1:A3–11.
  128. Gray-Munro JE, Seguin C, Strong M. Influence of surface modification on the in vitro corrosion rate of magnesium alloy AZ31. *J Biomed Mater Res A*. 2009;91(1):221–30.
  129. Mhaede M, Pastorek F, Hadzima B. Influence of shot peening on corrosion properties of biocompatible magnesium alloy AZ31 coated by dicalcium phosphate dihydrate (DCPD). *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 ;39:330–5.
  130. Zainal Abidin NI, Da Forno A, Bestetti M, Martin D, Beer A, Atrens A. Evaluation of Coatings for Mg Alloys for Biomedical Applications. *Adv Eng Mater*. 2015;17(1):58–67.
  131. Zhang E, Xu L, Yu G, Pan F, Yang K. In vivo evaluation of biodegradable magnesium alloy bone implant in the first 6 months implantation. *J Biomed Mater Res A*. 2009;90(3):882–93.
  132. Chen S, Guan S, Li W, Wang H, Chen J, Wang Y, et al. In vivo degradation and bone response of a composite coating on Mg-Zn-Ca alloy prepared by microarc oxidation and electrochemical deposition. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011;(2012):533–43.
  133. Wang J, Tang J, Zhang P, Li Y, Wang J, Lai Y, et al. Surface modification of magnesium alloys developed for bioabsorbable orthopedic implants: a general review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012;100(6):1691–701.

134. Gu Y, Bandopadhyay S, Chen C, Guo Y, Ning C. Effect of oxidation time on the corrosion behavior of micro-arc oxidation produced AZ31 magnesium alloys in simulated body fluid. *J Alloys Compd.* 2012;543:109–17.
135. Tan L, Wang Q, Lin X, Wan P, Zhang G, Zhang Q, et al. Loss of mechanical properties in vivo and bone-implant interface strength of AZ31B magnesium alloy screws with Si-containing coating. *Acta Biomater.* 2014;10(5):2333–40.
136. Chaya A, Yoshizawa S, Verdelis K, Noorani S, Costello BJ, Sfeir C. Fracture healing using degradable magnesium fixation plates and screws. *J Oral Maxillofac Surg.* 2015;73(2):295–305.
137. Henderson SE, Verdelis K, Maiti S, Pal S, Chung WL, Chou D-T, et al. Magnesium alloys as a biomaterial for degradable craniofacial screws. *Acta Biomater.* 2013;30:24–6.
138. Henderson SE, Verdelis K, Maiti S, Pal S, Chung WL, Chou D-T, et al. Magnesium alloys as a biomaterial for degradable craniofacial screws. *Acta Biomater.* 2014;10(5):2323–32.
139. Bell RB, Kindsfater CS. The use of biodegradable plates and screws to stabilize facial fractures. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64(1):31–9.
140. Yuen CK, Ip WY. Theoretical risk assessment of magnesium alloys as degradable biomedical implants. *Acta Biomater.* 2010;6(5):1808–12.







## COMUNICACIONES A CONGRESOS Y PREMIO

1. Seguimiento mediante tomografía axial computerizada de la consolidación en fracturas de fémur en ratas wistar y estudio de la degradación in situ de la aleación de magnesio AZ31. XVIII Congreso de la SEIQ. León 18-19 Octubre 2012.
2. Modificación superficial de biomateriales metálicos para disminuir la liberación de partículas en procesos de desgaste-corrosión. XVIII Congreso de la SEIQ. León 18-19 Octubre 2012.
3. Biodegradación de la aleación de magnesio az31 mediante el análisis de trazas metálicas en órganos de rata. XIX CONGRESO NACIONAL DE INVESTIGACIONES QUIRÚRGICAS. Madrid. 2013
4. Estudio clínico-radiológico e histológico de la aleación az31 en su uso como implante protésico. XIX CONGRESO NACIONAL DE INVESTIGACIONES QUIRÚRGICAS. Madrid. 2013
5. *In vitro/in vivo* biocompatibility and corrosion behaviour of metallic surfaces based on magnesium materials. Premio al mejor poster. 20 international LDDR local drug delivery meeting and cardiovascular course on revascularization and molecular strategies. Febrero, 2013. *PREMIO AL MEJOR POSTER*

## PUBLICACIONES

1. Comportamiento frente a la corrosión y biocompatibilidad in vivo/in vitro de la aleación AZ31 modificada superficialmente.

M. Carboneras, C. Iglesias, B.T. Perez-Maceda, J.A. del Valle, M.C. García-Alonso, M.A. Alobera, C. Clemente, J.C. Rubio, M.L. Escudero, R. Lozano  
Revista de Metalurgia 47 (2011) 212-223.

2. Materiales metálicos biodegradables en el campo biomédico.

M. Carboneras, C. Iglesias, E. Onofre, MA Alobera, C. Clemente, MC. García-Alonso, ML. Escudero.

Acta Científica y Tecnológica 19 (2011) 30-34.

3. Modeling in vivo corrosion of AZ31 as temporary biodegradable implants. Experimental validation in rats.

R. Montoya, C. Iglesias, ML Escudero, MC Garcia Alonso.

Materials Science and Engineering C 41 (2014) 127–133.

4. Computed tomography to follow up the fracture healing and the biodegradation in situ of magnesium alloy AZ31 in wistar femur fractures.

C. Iglesias, O.G. Bodelón, E. Onofre, N. Malpica, M.C. Garcia-Alonso, J.C. Rubio, M.L. Escudero.

British Journal of Surgery 100 (2013) 13.

5. Clinical-radiological and histological correlation of AZ31 alloy used as a prosthetic implant.

C. Iglesias, O.G. Bodelón, I. Diaz, R.M. Lozano, B.T. Pérez-Maceda, C. Clemente, M.A. Alobera, M.C. García-Alonso, J.C. Rubio, M.L. Escudero.

British Journal of Surgery 101 (2014) 6-7.

6. Analysis of metallic traces from biodegradation of AZ31 magnesium alloy in rat organs.

O. G Bodelón, C. Iglesias, I. Diaz, R.M. Lozano, B. T. Pérez-Maceda, C. Clemente, M. A. Alobera, M.C. García-Alonso, J. C. Rubio, M.L. Escudero.

British Journal of Surgery 101 (2014) 6.

7. Characterization of oxidized tialv after fretting-corrosion tests using near-field microscopy.

F. Billi, C. Iglesias, E. Onofre, R. M. Lozano, B. Pérez-Maceda, J. C. Rubio, M. L. Escudero, M. C. Garcia-Alonso.

British Journal of Surgery 100 (2013).

## BECAS Y FINANCIACIÓN

1. Este trabajo se encuentra englobado en el subproyecto ” **Estudio in vitro e in vivo de la Interacción célula-nuevas superficies de biomateriales metálicos de base Magnesio**” concedido a la Dra. Rosa Lozano del Centro de Investigaciones biológicas con referencia MAT 2008-05719-C03-02 y que se engloba dentro de un proyecto multicéntrico dirigido por la Dra. María Lorena Escudero que lleva por título **“Degradación de biomateriales metálicos de base mg nanoestructurados, reabsorbibles y multifuncionales. Estudio in vitro e in vivo”** del centro nacional de investigaciones metalúrgicas, CENIM.
2. Este trabajo se encuentra englobado en el subproyecto **“Biocompatibilidad celular de los productos metálicos de desgaste originados durante el proceso sinérgico de desgaste-corrosión de una aleación cocr en el par metal-metal”**. Con Dra. Rosa Lozano del CIB.CSIC. 2011 MAT2011-29152-C02-02, y que se engloba dentro de un proyecto coordinado dirigido por la Dra. María Cristina García Alonso que lleva por título **“Efecto sinérgico corrosión-desgaste en la aleación CoCr como prótesis osteoarticular metal/metal. caracterización de los productos de desgaste y su biocompatibilidad”** del Centro Nacional de Investigaciones Metalúrgicas (CENIM) del CSIC.

## **CONFLICTO DE INTERÉS**

No existe relación comercial ni financiera entre el presente trabajo, su autor y colaboradores y los productos que en él se enumeran.